

## Concentrações plasmáticas de triptamina, tiramina e feniletilamina em eqüinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e antiinflamatórios não esteroidais<sup>1</sup>

Paulo Tarso L. Botteon<sup>2\*</sup>, Vany P. Ferraz<sup>3</sup>, Maria Beatriz A. Glória<sup>4</sup>, Marília M. Melo<sup>5</sup>, Fabíola O. Paes Leme<sup>5</sup>, Rafael R. Faleiros<sup>5</sup> e Geraldo Eleno S. Alves<sup>5</sup>

**ABSTRACT.-** Botteon P.T.L., Ferraz V.P., Glória M.B.A., Melo M.M., Paes Leme F.O., Faleiros R.R. & Alves G.E.S. 2008. [**Plasmatic concentrations of tryptamine, tyramine and phenylethylamine in horses under the effect of carbohydrate overload and non-steroid antiinflammatory compounds.**] Concentrações plasmáticas de triptamina, tiramina e feniletilamina em eqüinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e antiinflamatórios não esteroidais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(6):299-302. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 30123-970, Brazil. E-mail: [paulobotteon@gmail.com](mailto:paulobotteon@gmail.com)

The concentrations of the bioactives amines tryptamine (TRP), tyramine (TYR) and phenylethylamine (PEA) were determined by gas chromatography in plasma samples of 20 horses submitted to carbohydrate overload. Thirty hours after the overload, the horses were randomly distributed in four groups (n=5) and were submitted to four IV treatments every 12 hours: 10ml of saline (GC), ketoprofen 2.2mg/kg (GK), phenylbutazone 4.4mg/kg (GF), and flunixin meglumine 1.1mg/kg (GFM). Blood samples were collected at various times after the overload (0-72 h). Plasma TYR and PEA concentrations ranged from 0.18 to 164.2mg/L, and differed significantly with time (p<0.01), but did not differ in the treatments. Plasma concentrations of TRP differed between times and treatments. The GC was significantly major than other treatments at 48h and 60h after the overload, and the plasma concentration of TRP in groups GK and GFM was significantly lower than in groups GF and GC at 72 h (p=0.0012). We concluded that the anti-inflammatory drugs evaluated do not interfere in the plasma concentration of TYP and PEA. For TRP, ketoprofen and flunixin meglumine was effective to reduce de plasmatic concentration of this amine.

INDEX TERMS: Amines, antiinflammatory compounds, laminitis, horse.

<sup>1</sup> Recebido em 31 de janeiro de 2008.

Aceito para publicação em 3 de março de 2008.

Parte do trabalho de Pós-Doutoramento do primeiro autor, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária (EV), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

<sup>2</sup> Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23851-970, Brasil. \*Autor para correspondência: [paulobotteon@gmail.com](mailto:paulobotteon@gmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Av. Antonio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31210-901, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG.

<sup>5</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, EV, UFMG, Belo Horizonte, MG..

**RESUMO.-** As concentrações plasmáticas das aminas triptamina (TRP), tiramina (TYR) e feniletilamina (PEA) foram determinadas por cromatografia gasosa (CG) de 20 eqüinos sob efeito de sobrecarga por carboidratos (SC). Após 36h da SC os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=5) e receberam a cada 12h por via iv: solução salina 10mL (GC), ketoprofeno 2,2mg/kg (GK), fenilbutazona 4,4mg/kg (GF) e flunixin meglumine 1,1mg/kg (GFM). As concentrações das aminas TYR e PEA variaram de 0,18 a 164,2mg/L, com diferenças nos tempos avaliados, mas não entre os tratamentos (p<0,01). A concentração plasmática de TRP apresentou diferenças entre os tempos e também entre os tratamentos. O GC diferiu dos demais nos momentos 48h e 60h e as con-

concentrações nos grupos GK e GFM foram menores que nos grupos GF e GC às 72h ( $P=0,0012$ ). Conclui-se que nas doses utilizadas os antiinflamatórios não esteroidais avaliados não interferem nas concentrações de TYR e PEA. Entretanto, o ketoprofeno e o flunixin meglumine foram efetivos em diminuir a concentração plasmática de TRP.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Aminas, antiinflamatório, laminite, equino.

## INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas (BA) são bases orgânicas com anéis alifáticos (putrescine, cadaverine, spermine, espermidina), aromáticos (tiramina, feniletilamina) ou heterocíclicos (histamina, triptamina), produzidas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos (Sillas Santos 1996). Essas exotoxinas são aminas encontradas no conteúdo intestinal de animais monogástricos e poligástricos (Hill et al. 1970, Bailey et al. 2003b).

Dietas ricas em carboidratos favorecem o crescimento das populações de *Lactobacillus* sp e *Streptococcus bovis*, aos quais foi associado ao aumento da concentração de aminas bioativas em equinos (Bailey et al. 2003a). Variações expressivas nas concentrações de triptamina (TRP), tiramina (TYR) e feniletilamina (PEA) foram verificadas no soro de equinos obtidos no inverno, alimentados com feno, e no verão, alimentados em pastagens ricas em fructanos (Bailey et al. 2003b).

Elliott et al. (2003) estudando os efeitos vasoativos das aminas triptamina, tiramina e feniletilamina concluíram que elas são potentes vasoconstritoras tanto em artérias como em veias, sendo a triptamina e a tiramina vasoconstritoras seletivas, ou seja, são mais potentes em veias que artérias.

Apesar de muitas pesquisas serem conduzidas continuamente, por vários grupos, em diversos países, ainda não foram elucidados todos os mecanismos envolvidos na patofisiologia da laminite. Entretanto, segundo Mungall (2001), aminas bioativas produzidas por *S. bovis* podem induzir a degradação enzimática da membrana basal lamelar. Baseado nestas informações este estudo teve como objetivo avaliar as concentrações das aminas triptamina, tiramina e feniletilamina em equinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidrato e tratados com os antiinflamatórios ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 equinos provenientes do município de Canaã, MG, hípidos (*Equus caballus caballus*), sem raça definida, machos castrados, com idade entre 3 e 15 anos, peso entre 264 e 344 kg e escore corporal de dois a três (Speirs 1997). Antes do experimento os animais passaram por quarentena, período em que foram avaliados, pesados e numerados de 1 a 20, sendo mantidos em piquete coletivo até sete dias antes da indução de laminite, recebendo água *ad libitum*, feno de coast cross e ração concentrada (Nutriage-

Guabi, 15% de proteína), duas vezes ao dia, em quantidades equivalentes a 2,5% e 1% de peso corporal, respectivamente. À ração foram adicionados 50g de sal mineralizado para equinos 7 dias antes da indução experimental os animais foram alojados em cocheiras individuais, privados da ração comercial e passaram por controle de endo e ectoparasitos, administrando-se uma base conjugada de ivermectina-pomoatos de praziquantel-pirantel<sup>6</sup> e deltametrina<sup>7</sup> respectivamente. Após a sobrecarga de carboidrato, os animais receberam suplemento eletrolítico<sup>8</sup> (25g/10L de água) adicionado diariamente à água de beber.

### Indução de laminite

Após jejum alimentar e hídrico de 12h, os animais receberam amido de milho<sup>9</sup> (20g/kg), segundo modificação do modelo experimental referido por Weiss et al. (1998). Cada quilograma de amido foi dissolvido em um litro de água, sendo passado via sonda nasogástrica (11mm). Imediatamente após a administração do amido os animais voltaram a receber o feno como anteriormente descrito.

### Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais (n=5) e, 36 h após a indução da laminite, receberam, a cada 12h; Grupo 1, ketoprofeno<sup>10</sup> (GK) 2,2mg/kg.; Grupo 2, fenilbutazona<sup>11</sup> (GF) 4,4mg/kg; Grupo 4 flunixin meglumine<sup>12</sup> (GFM) 1,1mg/kg e Grupo 4, solução salina<sup>13</sup> (GC)10mL. A via de administração utilizada foi a iv, sempre na jugular esquerda, preservando-se a direita para a coleta das amostras de sangue, utilizando-se frascos a vácuo, contendo EDTA<sup>14</sup>. As amostras foram colhidas antes da indução, seis horas após e a cada 12 horas até completar 72 horas de avaliação, totalizando oito amostras em cada repetição (0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h).

### Extração de aminas bioativas

Partindo-se das amostras de 1,5 mL de plasma colhidas em tubos com EDTA, promoveu-se a precipitação de proteínas através da adição de 100 µl de solução de ácido trifluoroacético<sup>15</sup> a 10moL. As amostras foram então centrifugadas<sup>16</sup> a 12.000rpm, por 15 min. Uma alíquota de 0,200 mL do sobrenadante foi transferida para tubos criogênicos<sup>17</sup> e submetidos a liofilização e armazenadas em freezer a -20°C.

O material liofilizado foi ressuspendido em 100µL de solução de anidrido trifluoroacético/acetona nitrila na proporção de 1:1. Esta solução foi homogeneizada em vórtex e aquecida ao microondas<sup>18</sup> por 3min a 60% da potência total do aparelho. Os derivados acilados foram secos em linha de nitrogênio e em

<sup>6</sup> Centurion-Valleé, Brasil.

<sup>7</sup> Butox-Intervet, Brasil.

<sup>8</sup> Plusvital-Marcolab, Brasil.

<sup>9</sup> Milhena-Nutril, Brasil

<sup>10</sup> Ketofen-Merial, Brasil.

<sup>11</sup> Equipalazone-Marcolab, Brasil.

<sup>12</sup> Flumegan-Marcolab, Brasil.

<sup>13</sup> Solução salina 0,9%-Sanobiol, Brasil.

<sup>14</sup> Vacutainer-Bacton and Dickinson, Brasil.

<sup>15</sup> Acido tricloroacético PA/ACS Cristal (marca Synth).

<sup>16</sup> Centrífuga 5415 D Eppendorf.

<sup>17</sup> Tubo criogênico c/ tampa de rosca, estéril (marca Alfa).

<sup>18</sup> Panasonic Piccolo 600 W.

seguida retomados com 50µL de acetonitrila marcada com padrão interno<sup>19</sup>, 2µL desta solução foram injetados no cromatógrafo<sup>20</sup> para análise.

### Cromatografia gasosa

As condições de operação foram 150°C, 1min, 7°C/min, 220°C, 20°C/min, 270°C, injetor e detector a 280°C, Split 1/100, sendo utilizada a coluna capilar<sup>21</sup>. Como gás de arraste utilizou-se o hidrogênio. Foram preparados quatro padrões de cada uma das aminas analisadas, triptamina (TRP), tiramina (TYR,) e feniletilamina (PEA) (Fig.1). As correlações entre a resposta obtida e a concentração nominal das aminas e o padrão interno

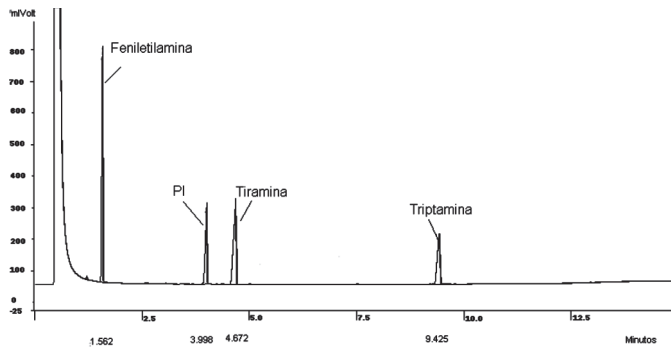


Fig.1. Cromatograma com os padrões de feniletilamina, padrão interno (PI), de tiramina e de triptamina.

foi realizada a partir de das concentrações de PEA (0,42; 0,84; 1,25; 1,67mg/mL); TYR (0,248; 0,495; 0,743; 0,990mg/mL); TRP (0,305; 0,610; 0,915; 1,220mg/mL) e o padrão interno (C18) a uma concentração constante de 0,74mg/mL:

$$\text{Concentração em mg/L} = (A_a/A_p)/F_{ci} \times C_p \times F$$

Aa = área do pico correspondente à amostra;

Ap = área do pico correspondente ao padrão interno;

F<sub>ci</sub> = fator de correção interno;

Cp = concentração da solução padrão interno (mg/L);

F = fator de diluição da amostra durante o processamento.

### Análise estatística

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade, apresentando dispersão não normal e não foi possível a transformação das variáveis. Os dados foram então analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. Empates foram encontrados nos dados e as correções apropriadas foram aplicadas. As médias foram submetidas a comparações múltiplas pareadas utilizando-se o procedimento de Dunn/ Teste bilateral.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações plasmáticas de TYR e PEA apresentaram variação semelhante nos tempos observados, elevando-se nas primeiras 6h (p=0,0012) após o fornecimento de 20g/kg de amido aos equinos. As médias variaram de

2,7 e 6,21mg/L para a TYR e PEA, respectivamente, na hora 0, para 682,8 e 124,9mg/L no tempo 6h (Quadros 1 e 2).

A oferta de amido em quantidade elevada favorece o desenvolvimento de bactérias fermentativas e a concentração das aminas aumenta em proporção direta à população microbiana (Chin & Koehler 1986, Bailey et al. 2003a). Bailey et al. (2003b) sugeriram que a sobrecarga por carboidratos pode favorecer a absorção de aminas pelo trato digestivo, devido ao dano causado à barreira presente na mucosa intestinal, sendo que a tiramina e a feniletilamina foram apontadas como iniciadoras da hipertensão subsequente. Nout (1994) salientou que a tiramina em alimentos deve estar em concentração entre 100-800mg/kg, pois se torna tóxica acima de 1080mg/kg.

Seguindo-se o pico observado 6h após a administração do amido nos equinos deste estudo, as concentrações regrediram a 0,11 e 1,05mg/L para TYR e PEA às 24 h, chegando a 1,04 e 0,95 72 h após a administração de amido (Quadros 1 e 2). Não houve diferença entre os tratamentos, mas sim entre os tempos avaliados. Bailey et al. (2003b) observaram concentrações plasmáticas variando de 10pM a 100nM em pôneis normais e com laminites, respectivamente, valores muito menores que os

### Quadro 1. Concentrações séricas de feniletilamina em equinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e tratados com ketoprofeno (GK) 2,2mg/kg, fenilbutazona (GF) 4,4mg/kg, flunixin meglumine (GFM) 1,1mg/kg e solução salina (GC) 10mL

Hora	GK	GF	GFM	GC
0	3,72 abcA	13,97 aA	2,36 aA	13,17 aA
6	190,10 aA	256,37 aA	182,36 aA	156,70 aA
12	3,92 abA	6,36 aA	2,30 abA	17,33 aA
24	3,74 abcA	1,14 bA	1,97 bA	2,14 abA
36	2,37 bcA	1,99 bA	9,44 aA	3,43 abA
48	0,76 bcA	1,12 bA	3,01 aA	1,97 abA
60	0,22 cA	3,00 abA	0,57 bA	1,07 bA
72	1,37 bA	0,71 bA	1,06 abA	0,57 bA

Médias seguidas de mesmas letras (minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha) não diferem significativamente (p<0,0001).

### Quadro 2. Concentrações séricas de tiramina em equinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e tratados com ketoprofeno (GK) 2,2mg/kg, fenilbutazona (GF) 4,4mg/kg, flunixin meglumine (GFM) 1,1mg/kg e solução salina (GC) 10mL

Hora	GK	GF	GFM	GC
0	0,27 aA	8,73abA	1,32 aA	0,82 aA
6	1011,95 bA	1384,88 bA	1084,01 bA	574,17 bA
12	4,87 abA	0,32 abA	0,26 aA	10,02 abA
24	0,36 aA	0,07 aA	0,22 aA	0,25 aA
36	1,25 abA	0,49 abA	1,30 aA	1,07 aA
48	0,29 aA	0,16 aA	0,76 abA	0,44 aA
60	0,86 abA	0,60 abcA	0,59 abA	1,62 abA
72	3,11 aA	0,93aA	0,55 abA	0,41 aA

Médias seguidas de mesmas letras (minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha) não diferem significativamente (p = 0,0011).

<sup>19</sup> C18 - Octadecano 0,74g/L.

<sup>20</sup> Cromatógrafo a gás Varian CP-3380.

<sup>21</sup> BP10 ( 14% cyanopropylphenyl dimethyl siloxane) 25m x 0.22mm x 0,25µm (SGE).

**Quadro 3. Concentrações séricas de triptamina em eqüinos sob efeitos de sobrecarga de carboidratos e tratados com ketoprofeno (GK) 2,2mg/kg, fenilbutazona (GF) 4,4mg/kg, flunixin meglumine (GFM) 1,1mg/kg e solução salina (GC) 10mL**

Tempo	GK	GF	GFM	GC
0	0,87aA	0,82 abA	0,61 aA	1,49 acA
6	0,21aA	0,49 abA	0,71 aA	0,51 abA
12	0,74 aA	0,35 abA	0,44 aA	0,74 abA
24	0,43 aA	0,00 bA	0,19 aA	0,05 bA
36	0,14aA	0,33 abA	0,80 aA	0,79 abA
48	0,52 aA	0,93 abA	0,67 aA	2,28 cB
60	2,75 aA	2,35 aB	3,01 aB	7,20 cB
72	2,21 aA	6,85 aB	2,76 aA	6,95 cB

Médias seguidas de mesmas letras (minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha) não diferem significativamente ( $p = 0,0012$ ).

observados nos eqüinos deste trabalho. Tal fato certamente foi devido às diferenças metodológicas e entre as populações estudadas.

As concentrações de TRP variaram de forma distinta ao longo do tempo. Mantiveram-se estáveis até 36h, médias de 0,13; 0,33; 0,80 e 0,79mg/L, respectivamente para os tratamentos com GK, GF, GFM e GC, elevando-se para 2,21; 6,85; 2,76 e 6,95mg/L, no momento 72h, quando os tratamentos GK e GFM diferiram de GF e GC ( $p=0,0011$ ) (Quadro 3). O GC também diferiu dos demais grupos nos momentos 48h e 60h. A triptamina tem efeito hipertensivo em seres humanos (Shalaby 1996). Triptamina, tiramina e feniletilamina foram identificadas como causadoras de vasoconstrição *in vitro* em artérias e veias digitais de eqüinos (Bailey et al. 2000, 2001). Bailey et al. (2004) injetaram triptamina (1,6  $\mu$ g/kg/min) e feniletilamina (2,13g/kg/min) em eqüinos e observaram decréscimo na irrigação arterial digital (média  $\pm$  d.p. 29,2 $\pm$ 8,5 e 18,4 $\pm$ 6,8%, respectivamente), o que resultou em decréscimo na temperatura da parede dorsal do casco (0,6 $\pm$ 0,1°C e 0,5 $\pm$ 0,1°C) para triptamina e feniletilamina, respectivamente.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a administração dos antiinflamatórios ketoprofeno e flunixin meglumine minimiza os efeitos decorrentes da presença de triptamina na circulação sanguínea, oriundas de distúrbios entéricos

fermentativos em eqüinos, entretanto, não altera as concentrações plasmáticas de tiramina e feniletilamina.

**Agradecimentos.**- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Pós-Doutorado Júnior (PDJ) e o suporte financeiro (Proc.154922/2006-4).

## REFERÊNCIAS

- Bailey S.R., Rycroft A. & Marr C.M. 2000. Identification and quantification of amines in equine caecal liquor. Proc. 39th Brit. Equine Vet. Assoc. Congr., p.206-207.
- Bailey S.R., Rycroft A. & Marr C.M. 2001. Effect of carbohydrate overload on production of vasoactive amines in equine caecal contents *in vitro*. Proc. 40th Brit. Equine Vet. Assoc. Congr., p.213.
- Bailey S.R., Bailon M.L., Rycroft A.N., Harris P.A., Elliott J. 2003a. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an *in vitro* model of carbohydrate overload. Appl. Environ. Microbiol. 69(4):2087-2093.
- Bailey S.R., Katz L.M., Berhane Y., Samuels T., De Brauvere N., Marr C.M. & Elliott J. 2003b. Seasonal changes in plasma concentrations of cecum-derived amines in clinically normal ponies predisposed to laminitis. Am. J. Vet. Res. 64:1132-1138.
- Bailey S.R., Menzies-Gow N.J. & Marr C.M. 2004. The effects of vasoactive amines found in the equine hindgut on digital blood flow in the normal horse. Equine Vet. J. 36(3):267-272.
- Chin E.D. & Koehler P.E. 1986. Effect of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine, and tyramine during miso fermentation. J. Food Prot. 49:423-427.
- Elliott J., Berhane Y. & Bailey S.R. 2003. Effects of monoamines formed in the cecum of horses on equine digital blood vessels and platelets. Am. J. Vet. Res. 64:1124-1131.
- Hill I.R., Kenworthy R., Porter P. 1970. Studies of the effect of dietary lactobacilli on intestinal and urinary amines in pigs in relation to weaning and post-weaning diarrhea. Res. Vet. Sci. 11:320-326.
- Mungall B. A., Kyaw-Tanner M. & Pollitt C.C. 2001. *In vitro* evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. Vet. Microbiol. 79:209-223.
- Nout M.J.R. 1994. Fermented foods and food safety. Food Res. Int. 27:291-298.
- Shalaby A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food. Res. Internat. 29:675-690.
- Sillas Santos M.H.1996. Biogenic amines: their importance in foods. Food Res. Int. 29:213-231.
- Speirs V.C. 1997. The alimentary tract, p.261-298. In: Speirs V.C. (ed.), Clinical Examination of Horses. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Weiss D.J., Evanson A.O., McClenahan D., Fagliari J.J., Dunnwiddie C.T. & Wells R.E. 1998. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. Am. J. Vet. Res. 59:814-817.