



Atividade Induzida pelo Riluzole sobre a Preparação Neuromuscular *Biventer Cervicis* de Pintainho

Ana Paula Perin¹, Ana Paula Lucho¹, Lucas Fávero Sanches¹, Chariston André Dal Belo¹, Lucia Vinadé¹.

¹ CIPBIOTEC, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus São Gabriel, Av. Antônio Trilha, 1847, Centro, São Gabriel, RS, Brasil. E-mail: anaperin.app@gmail.com

RESUMO

Nesse trabalho, foi ensaiada a droga riluzole, sobre a junção neuromuscular esquelética de ave. O riluzole (2, 4, 5 e 10 µM) foi ensaiado em preparação músculo biventer cervicis de pintainhos, em banho de órgão isolado. Foram feitos registros da amplitude da força de contração muscular (FCM) e das respostas à ACh (110 µM) e ao KCl (20 mM) em presença do riluzole durante 120 min. O riluzole induziu resposta tempo e dose-dependente. Assim, as concentrações de 2 e 4 µM, não induziram alterações da FCM e nem das respostas à ACh e ao KCl (n=6). No entanto, a dose de 5 µM, houve uma diminuição significativa da resposta contrátil (p<0.05) e da resposta ao KCl. Na concentração de 10 µM (n=6), houve uma facilitação significativa (p<0.05) de ambas as respostas contráteis e evocadas pela ACh. Conclui-se que o riluzole exerce atividade dose-dependente direta sobre a junção neuromuscular de ave.

Palavras-chave: Riluzole, acetilcolina, sistema colinérgico, biventer cervicis, ELA

INTRODUÇÃO

O riluzole, é quimicamente relacionado aos benzotiazóis, e é conhecido como um agente neuroprotetor, possuindo propriedades anticonvulsivantes, analgésicas, anestésicas, e sedativas^{1 2 3}. Até o momento, esse composto é o único medicamento indicado para o tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), uma doença neurodegenerativa, progressiva e, até o momento, incurável⁴. Tratamentos clínicos mostram que a droga evita a progressão da doença e ameniza os sintomas, aumentando a sobrevida dos pacientes⁵.

A ação neuroprotetora da droga ocorre através da inibição da neurotransmissão glutamatérgica, pela redução da liberação do glutamato (GLU) no sistema nervoso central (SNC)⁶. Também é relatado que o riluzole exerce efeitos sobre a neurotransmissão nicotínica do sistema nervoso central, o que auxiliaria na redução do processo de excitotoxicidade induzida pelo GLU⁷. Pesquisas *in vivo*, em ratos com neuropatia periférica pós-traumática, sugerem que o tratamento com riluzole, induz melhora no desempenho motor⁸. Por outro lado, ainda não existem registros na literatura, que demonstrem a atividade direta do riluzole, sobre a junção neuromuscular esquelética.

O objetivo desse trabalho foi investigar as ações induzidas pelo riluzole, sobre a junção neuromuscular esquelética de aves, usando-se parâmetros eletromiográficos.



MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes: Todos os reagentes usados foram do mais alto grau de pureza e forma obtidos das empresas Merck e Sigma-Aldrich. O riluzole (2-amino-6[trifluoromethoxy] benzo-thiazole), foi obtido da Sigma-Aldrich Brasil (São Paulo-SP, Brasil).

Animais: Foram usados pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4-10 dias), comprados em granjas certificadas. Os animais permaneceram alojados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com livre acesso à água e ração. Todos os ensaios foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais-CEUA/UNIPAMPA, sob o protocolo nº 011/2012.

Ensaio biológico

Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho: A preparação músculo *biventer cervicis* de pintainhos foi isolada e montada de acordo como descrito por Ginsborg and Warriner⁹. Para tanto, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com injeção de cloral hidratado (300 mg/kg) Após a afixação em placa de dissecação, procedeu-se a dissecação para a retirada dos músculos. Após a retirada, os músculos foram amarrados com linha de sutura, em um transdutor isométrico (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil) e montados em uma cuba de registros de 6 ml, em banho de órgão isolado (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil). Os músculos foram banhados em solução nutritiva de Krebs, contendo em mM: 120 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 2,6 NaHCO₃, 1,19 MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄ e 11 glicose, aerado constantemente com carbogênio (mistura 95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantido a 37 °C e pH 7.4. Foram aplicados estímulos elétricos supramaximais indiretos (0.1Hz, 0.2ms, 4-6V), por meio de eletrodos bipolares de prata cloretada, conectados a um estimulador elétrico modelo AVS100-C4 (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil). Os registros das contrações musculares e das contraturas foram obtidos em polígrafo de quatro canais (AVS Equipamentos LTDA, São Carlos-SP, Brasil). Antes da adição dos tratamentos, as preparações foram estimuladas durante 30 minutos para a estabilização dos registros. Os registros foram feitos durante 120min; registros controle somente com a solução de Krebs também foram realizados.

Análise estatística: Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos. A significância foi obtida pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA/MANOVA) e comprovados pelo teste "t" de *Student*. Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas preparações controle somente com a solução de Krebs, não houve alterações da (FCM). O riluzole induziu uma resposta tempo e dose-dependente. Assim, as concentrações de 2 e 4 μM , não induziram alterações da FCM (Fig 1) e nem das respostas à ACh e ao KCl (n=6) (Fig.2). No entanto, a dose de 5 μM (n=6), promoveu uma diminuição significativa da resposta contrátil ($p < 0.05$) (Fig 1) e da resposta ao KCl (Fig.2). Na concentração de 10 μM (n=6), houve uma facilitação significativa ($p < 0.05$) de ambas as respostas contráteis e evocadas pela ACh (Fig 1 e Fig.2), respectivamente. O riluzole, é reconhecido como um inibidor de canais de cálcio voltagem-dependentes¹⁰. Sugere-se que a inibição da força de contração neuromuscular, observada com a concentração de 5 μM esteja associada a uma



Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

III SIMBBTEC
Londrina 2013

interação direta do riluzole, com os canais de cálcio voltagem-dependentes musculares, já que houve diminuição da contratura ao KCl. No entanto, em concentrações maiores, um efeito positivo direto do riluzole sobre os receptores nicotínicos da placa motora parece acontecer, pelo aumento da força de contração muscular, bem como da amplitude das contraturas à ACh.

Figura 1. Registros médios da força de contração muscular da preparação músculo *biventer cervicis* de pintainhos, em presença de diferentes concentrações do riluzole. *Significância em relação ao controle Krebs.

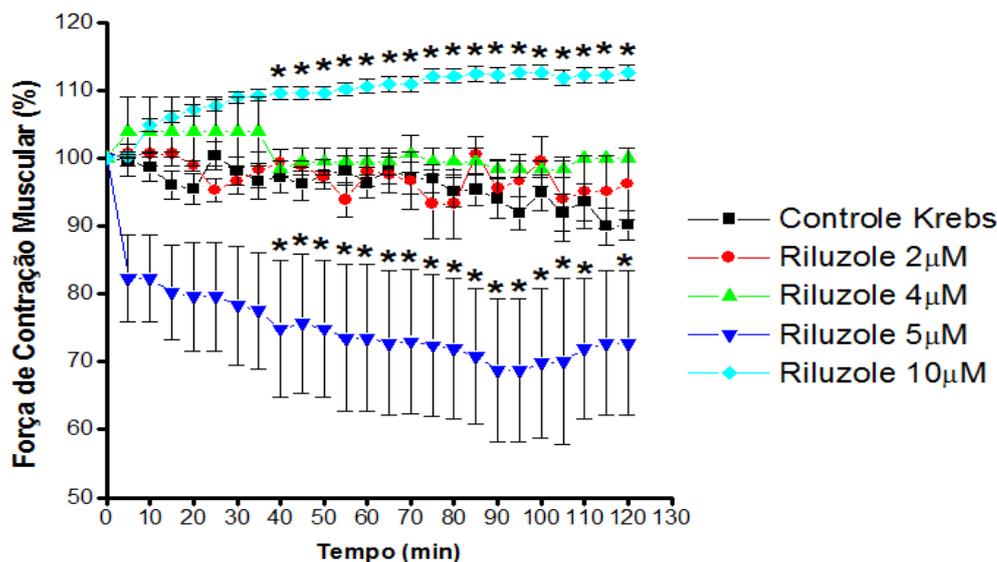
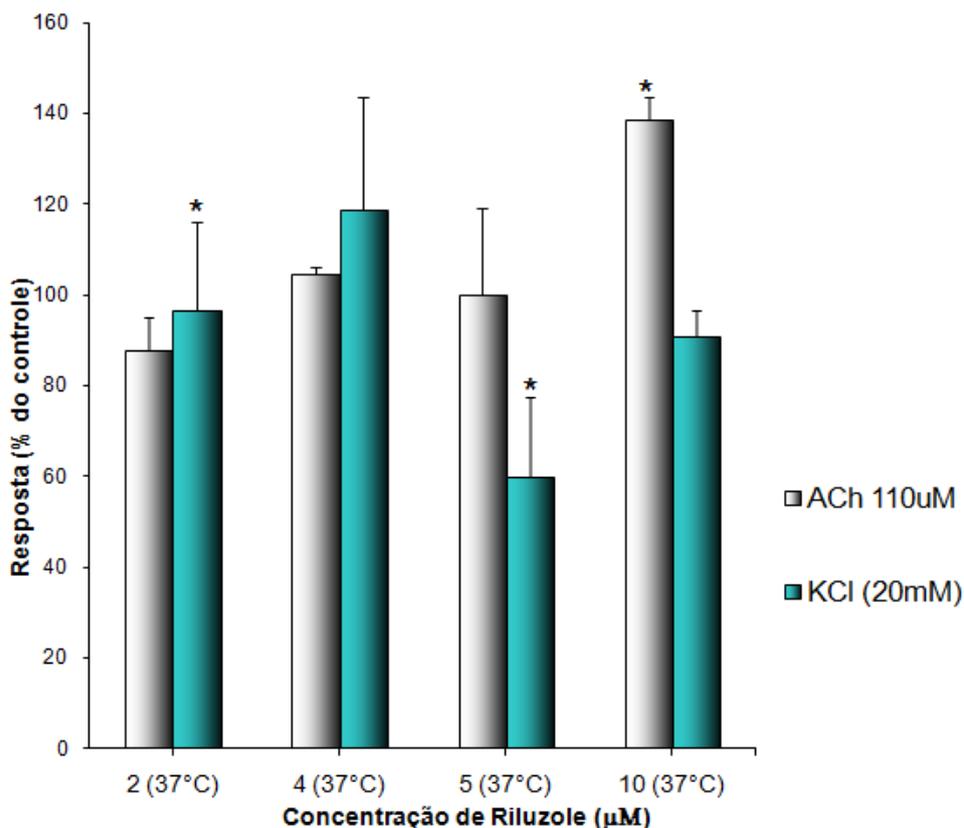


Figura 2. Amplitudes médias das contraturas elicitadas pela adição de ACh (110 μM) e KCl (20 mM) em preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho. *Significância em relação ao controle Krebs.



SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER



CONCLUSÃO

O riluzole exerce uma atividade tempo e dose-dependente em preparação neuromuscular de ave. Conclui-se que o riluzole exerce um efeito positivo direto sobre a placa motora, na concentração de 10 µM. Esse resultado reforça o uso do riluzole para o tratamento de distrofias neuromusculares.

Apoio Financeiro: CAPES, FAPERGS, Programa de Bolsas de Desenvolvimento Acadêmico PBDA-UNIPAMPA.

REFERÊNCIAS

- (1) BENAVIDES, J.; CAMELIN, J.C.; MITRANI, N. 2-amino-6-trifluoromethoxy enzothiazole: a possible antagonist of excitatory aminoacid neurotransmission. Biochemical properties. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 11, p. 1085-92, Nov. 1985.
- (2) PRATT, J.; RATAUD, J.; BARDOT, F.; ROUX, M.; BLANCHARD, J.C.; LADURON, P.M.; STUTZMANN, J.M. Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischemia. **Neurosci Lett.**, v.140, n. 2, p. 225-30, Jun. 1992.
- (3) CODERRE, T.J.; KUMAR, N.; LEFEBVRE, C.D.; YU, J.S. A comparison of the glutamate release inhibition and anti-allodynic effects of gabapentin, lamotrigine, and riluzole in a model of neuropathic pain. **J Neurochem.**, v.100, n. 5, p. 1289- 99, Mar. 2007.
- (4) GLICKSMAN, M.A. The pre-clinical discovery of Amyotrophic Lateral Sclerosis Drugs. **Expert Opin Drug Discov.**, v. 6, n. 11, p. 1127- 38, Nov. 2011.



SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia
Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

- (5) MILLER, R.G.; MITCHELL, J.D.; LYON, M.; MOORE, D.H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 1 , CD001447, Jan. 2004.
- (6) DOBLE, A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. **Neurology.**, v. 47 , n. 6 , p. 233-41, Dec. 1996.
- (7) KANEKO, S.; MAEDA, T.; KUME, T.; KOCHIYAMA, H.; AKAIKE, A.; SHIMOHAMA, S.; KIMURA, J. Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via-7 neuronal receptors and neuronal CNS receptors. **Brain Res.**, v.765 , n. 1, p. 135- 40, Aug. 1997.
- (8) MEDICO, M.; NICOSIA, A.; GRECH, M.; ONESTA, M.; SESSA, G.; RAMPELLO, L.; DRAGO, F. Riluzole restores motor activity in rats with post-traumatic peripheral neuropathy. **Neurosc Lett.**, v.358 ,n.1 , p. 37-40, Mar. 2004.
- (9) GINSBORG, B.L.; WARRINER, J.; 1. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. Br J Pharmacol. **Chemother**, v.15, n.3, p. 410-411, Sep. 1960.
- (10) HUANG, C.S.; SONG, J.H.; NAGATA, K.; YEH, J.Z.; NARAHASHI, T.; Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 82, n. 3, p. 1280-90.