

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Ciências Biológicas

Gabriela Brendel Blum

**Avaliação da atividade anti-inflamatória do
bromidrato de galantamina**

Porto Alegre

2014

Gabriela Brendel Blum

Avaliação da atividade anti-inflamatória do bromidrato de galantamina

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Co-orientadora: Dra. Fernanda Spies

PORTO ALEGRE
2014

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMO.....	5
INTRODUÇÃO	
Inflamação.....	6
Peritônio.....	6
Articulação e líquido sinovial.....	7
Artrite Reumatoide.....	9
TNF- α na Artrite Reumatoide.....	10
Tratamentos utilizados na AR.....	11
Via colinérgica anti-inflamatória.....	12
Bromidrato de Galantamina.....	13
Modelos de estudo em animais.....	14
Modelo de estudo <i>in vitro</i>	15
JUSTIFICATIVA.....	17
OBJETIVOS.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
APÊNDICE.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha 7$ nAChR	Subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico acetilcolínico
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
AR	Artrite Reumatoide
CIA	Artrite induzida por colágeno
CFA	Adjuvante Completo de Freund
DMARD	Drogas anti-reumáticas modificadores da doença
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FLS	Fibroblastos Sinoviais
i.a.	Intra-articular
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
HMGB1	Proteína de alta mobilidade box 1
LPS	Lipopolissacarídeo
mBSA	Albumina Bovina Sérica Metilada
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NSAID	Drogas antiinflamatórias não esteróides
PBS	Tampão fosfato salino
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B
s.c.	Subcutânea
SRB	Sulforrodamina B
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes no tecido imediatamente após o dano. A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia desconhecida caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva. Os tratamentos utilizados em pacientes com AR ainda apresentam limitações e significativos efeitos adversos, salientando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. A Galantamina é um alcaloide extraído da planta *Galanthus woronowi*, e pode ter um papel anti-inflamatório pois é capaz de interagir especificamente com o receptor nicotínico alfa sete. Com o objetivo de avaliar a eficácia do bromidrato de galantamina como terapia anti-inflamatória, foram testados o modelo de: monoartrite induzido por mBSA *in vivo*; peritonite induzida por LPS *in vivo*; viabilidade e invasão de células de fibroblastos sinoviais isolados de camundongo *in vitro*. Nos modelos *in vivo*, camundongos Balb/c tiveram inflamação induzida por mBSA através de desafio intra-articular ou por injeção intraperitoneal de LPS, respectivamente. Os animais foram divididos em grupos e receberam os seguintes tratamentos: bromidrato de galantamina, dexametasona ou salina. Em ambos os modelos a migração celular para o local da inflamação foi avaliada e a nocicepção das patas traseiras foi medida somente no modelo de mBSA. No modelo de viabilidade celular, as linhagens de fibroblastos receberam bromidrato de galantamina ou Reminyl em diferentes concentrações para avaliar se esses provocam citotoxicidade. A maior concentração testada que não provocou morte celular foi utilizada para o experimento de invasão, que compara a capacidade dos fibroblastos sinoviais tratados e não-tratados de invadir uma membrana de colágeno atraídas por quimiotaxia. No modelo de mBSA, não houve diminuição da nocicepção nem da migração celular dos tratados em comparação aos que receberam salina. No experimento peritonite, pode-se observar que o número médio de células presentes no líquido peritoneal é maior no grupo que recebeu salina em relação aos grupos que receberam os tratamentos, mas não estatisticamente significativa. No modelo de viabilidade, o bromidrato de galantamina e o Reminyl não apresentaram efeito citotóxico nas linhagens e concentrações testadas. Já no experimento de invasão, observou-se a diminuição de 11 a 31% na quantidade de células que invadiram a matriz de colágeno na presença do tratamento, em relação ao controle. Mais estudos precisam ser feitos para que o papel anti-inflamatório e possível uso frente a artrite reumatóide do bromidrato de galantamina seja confirmada.

Palavras-chave: Artrite reumatoide, bromidrato de galantamina, modelo de mBSA, modelo de peritonite, invasão, anti-inflamatório

INTRODUÇÃO

Inflamação

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (Cruvinel *et al.*, 2010).

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes no tecido imediatamente após o dano. Ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão. O endotélio torna-se ativado, expressando moléculas de superfície que favorecem a aderência dos leucócitos e a eventual migração destes para os tecidos. Na inflamação aguda, as principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos (Cruvinel *et al.*, 2010).

Na inflamação crônica, em geral ocasionada por persistência do estímulo nóxico, o processo inflamatório se mantém e sofre alterações qualitativas, caracterizadas por mudança progressiva nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido (Abbas e Lichtman, 2003) . A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo, havendo concomitância de destruição e reparo tecidual. O tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose.

A magnitude da resposta inflamatória é crucial: respostas insuficientes causam imunodeficiência, o que pode levar a infecções e câncer; respostas excessivas causam morbidade e mortalidade em doenças tais como a artrite reumatóide, doença de Crohn, aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, e isquemia cerebral e do miocárdio (Tracey, 2002).

Peritônio

O peritônio é uma membrana serosa, lisa e delicada, que reveste a parede e as vísceras do abdômen e pélvis e é constituída de fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e células mesoteliais. Apresenta dois folhetos: o parietal, que reveste a cavidade abdominal e o visceral que reveste os órgãos (Margetts e Brimble, 2006; Kuiper, Van Buuren e De Man,

2007). Entre esses folhetos, existe uma cavidade virtual denominada cavidade peritoneal, por onde circula o líquido peritoneal ou ascítico (Mutsaers, 2002), que se apresenta sob a forma de um líquido transparente, amarelo claro, estéril e viscoso e é produzido pelas células da membrana como um ultrafiltrado do plasma (Strasinger, 2000).

Reconhece-se que população de células presente no peritônio é constituída principalmente por macrófagos e linfócitos, e sabe-se que a proporção de células é alterada pela introdução de materiais estranhos para dentro da cavidade peritoneal (Shelton e Rice, 1959).

Shelton e colaboradores (1970) demonstraram que camundongos da linhagem Balb/c machos apresentaram variação na quantidade e na proporção de células no líquido peritoneal ao longo de seu desenvolvimento. A análise foi feita através da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos dessa linhagem de diferentes idades. Com 66 dias de vida, estes apresentaram um total $2.3 (2.1-2.6) \times 10^6$ células no líquido peritoneal (figura 1), sendo estas principalmente macrófagos (1.0 a 1.5×10^6) e linfócitos.

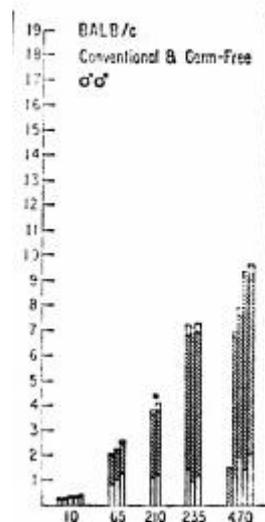


Figura 1 - Contagem total e diferencial de células peritoneais de camundongos Balb/c machos. No eixo das abscissas está representado a idade em dias, e no eixo das ordenadas o número de células $\times 10^6$. Macrófagos estão representados pelas barras brancas na base, linfócitos estão representados pelas barras hachuradas e leucócitos polimorfonucleares e mastócitos pelas barras brancas no topo (Shelton, Daves e Hemmer, 1970).

Articulação e líquido sinovial

As articulações diartrodiais (permitem livre movimentação) são delimitadas por uma cápsula articular, composta de duas camadas: uma externa, consistindo de tecido conjuntivo espesso e fibroso, e uma interna, de tecido delicado e fino, que é a membrana sinovial, a qual

reveste internamente o espaço articular, com exceção da cartilagem articular (Bhosale e Richardson, 2008).

A membrana sinovial, também conhecida por sinóvia, é um tecido conjuntivo membranoso vascularizado que encapsula as articulações. É alvo da maioria das doenças autoimunes sistêmicas, portanto há necessidade de compreensão de sua estrutura e fisiologia para o manejo dessas doenças (Bhosale e Richardson, 2008).

A sinóvia está dividida em camada íntima e camada subíntima. A primeira é a camada superficial que está em contato com a cavidade intra-articular e produz líquido sinovial lubrificante. Normalmente, possui de duas a três células de profundidade e é composta por dois tipos de células, em proporções relativamente iguais: células sinoviais (macrófagos-like) ou macrófagos sinoviais e células sinoviais (fibroblast-like synoviocyte, FLS) ou fibroblastos sinoviais. FLS são células mesenquimais que exibem muitas características de fibroblastos, incluindo expressão de colágenos do tipo IV e V e vimentina (Bartok e Firestein, 2010).

Os macrófagos sinoviais são recrutados a partir da medula óssea, se localizam na parte superior da camada sinovial íntima e expressam complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) para a apresentação de antígenos. Os fibroblastos sinoviais têm extensões citoplasmáticas que se estendem para a superfície da sinóvia e são os responsáveis pela produção dos componentes presentes no líquido sinovial, como glicosaminoglicanos, metaloproteinases, inibidores de metaloproteinase, citocinas, entre outros encontrados na matriz extracelular. Expressam moléculas de adesão que podem direcionar a passagem de neutrófilos para o líquido sinovial.

Já a camada subíntima possui elementos vasculares que fornecem nutrientes, não só para a membrana sinovial, mas também para a cartilagem avascular. Também é constituída por tecido conjuntivo que pode ser do tipo fibroso, adiposo ou areolar. Está presente uma rede de nervos simpáticos e sensoriais (Caola, 2003).

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo que recobre as superfícies articulares dos ossos, conferindo elasticidade, resiliência, e flexibilidade e permitindo o deslizamento suave das extremidades ósseas, absovendo o choque durante o movimento articular. É formada por células denominadas condrócitos e condroblastos, matriz extracelular e revestimento pelo pericôndrio (Caola, 2003).

Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia desconhecida, com manifestações autoimunes e caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas (Kinne *et al.*, 2000). No Brasil, um estudo de 2004 mostrou uma prevalência de 0,46% na população (Senna *et al.*, 2004). É uma importante causa de incapacidade funcional e está associada com um aumento de mortalidade (Firestein, 2003). Acomete preferencialmente o sexo feminino, com tendência a surgir após à quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década. A AR é uma doença muito heterogênea em termos de gravidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico (Brenol *et al.*, 2007).

Na tentativa de esclarecer a etiologia da AR, pesquisas sugerem fatores genéticos, defeitos na imunorregulação e mecanismos que levam ao dano tecidual (Andreoli e Bennett, 1998). Possíveis desencadeadores são lesões, infecções e exposições a substâncias tóxicas (tabagismo, por exemplo), que em conjunto com anormalidades na resposta imune celular e humoral levam para a ocorrência de auto-anticorpos (fator reumatoide e os anticorpos contra peptídeos/proteínas citrulinados), assim como a imigração de células T e células B para a sinóvia, que em interação complexa com macrófagos podem desencadear a doença. Estas células ou os seus produtos são, por conseguinte importantes alvos de terapia (Burmester, Feist e Dörner, 2014).

O evento inicial da doença, portanto é o processo inflamatório principiado na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. Este pode adquirir uma estrutura similar ao de tecidos linfoides terciários, com predomínio de linfócitos T CD4+. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à formação do “pannus” (tecido sinovial proliferado, figura 2) (Miossec, 2004). O “pannus” cresce de modo quase semelhante a um tumor benigno, invadindo a cartilagem, ativando os condrócitos e liberando as enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso subcondral, resultando, por fim, em erosões e destruição articular (Andreoli e Bennett, 1998).

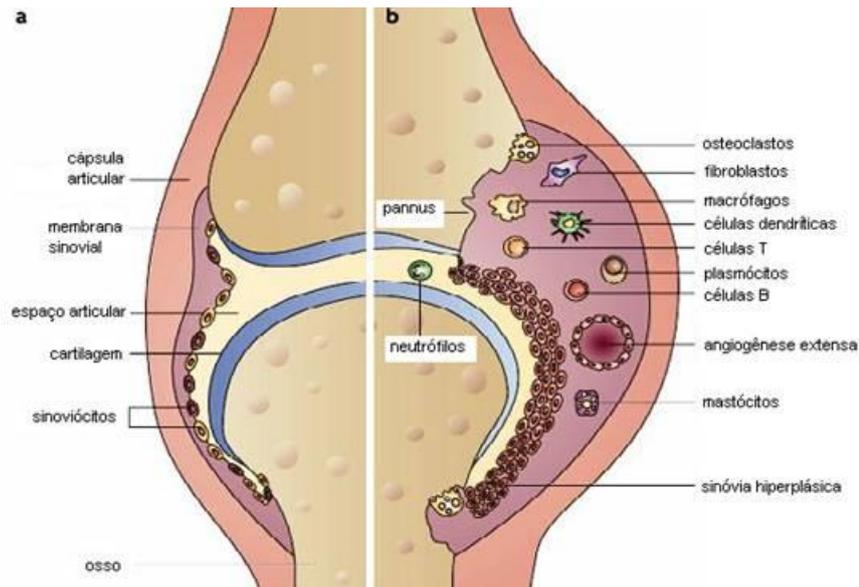


Figura 2 - (a) Articulação saudável; (b) Articulação doente, com a formação do pannus infiltrado celular. Imagem retirada de Smolen e Steiner (2003).

A produção de citocinas, predominantemente as pró-inflamatórias, tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. A resposta T auxiliar do tipo 1 gera a produção de interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$), que estimula a liberação do Fator de Necrose Tumoral Alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais (Dörner e Burmester, 2003).

Em resumo, a AR caracteriza-se por diversas etapas: a ativação inicial do sistema (auto)imune que conduz à cascata inflamatória (fase de iniciação); estabelecimento de patologia crônica (por vezes referido como "cronificação"), com a perpetuação de processos inflamatórios nas articulações e determinados locais extra-articulares (fase de transformação); e, finalmente, a destruição dos tecidos alvo, resultando em danos irreversíveis de órgãos (fase efetora) (Burmester, Feist e Dörner, 2014).

Sabe-se que a patologia envolve produção e liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, tais como, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IL-6 , e acredita-se que os macrófagos sinoviais sejam as células que participem efetivamente desse processo (Scott, Wolfe e Huizinga, 2010). Ainda, os fibroblastos sinoviais possuem um papel chave na invasão e destruição tecidual da articulação (Müller-Ladner *et al.*, 1996).

TNF- α na Artrite Reumatoide

As citocinas estão envolvidas em cada fase da patogênese da artrite reumatóide, através da promoção da autoimunidade (incluindo a fase de pré-articular, pelo menos em

modelos animais de artrite), da manutenção de sinovite inflamatória crônica e conduzindo a destruição de tecidos da articulação adjacente. As citocinas, portanto, integram os eventos imuno-reguladoras e de tecidos-destrutivo que fundamentam a apresentação clínica e progressão da artrite reumatoide (McInnes e Schett, 2007).

O TNF- α é considerado uma das principais citocinas, e seu principal efeito fisiológico é promover a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. Os mecanismos fisiológicos e moleculares que controlam a produção de TNF mantêm a homeostase e minimizam ou evitam danos durante a resposta do hospedeiro à infecção, lesão, artrite, e outras desordens (Storey, Comer e Scott, 1994).

O mecanismo de ação anti-TNF- α in vivo é complexo e provavelmente inclui supressão de outras citocinas pró-inflamatórias, diminuição da infiltração celular sinovial, interferência com a ativação dos osteoclastos, e diminuição da angiogênese (Feldmann e Maini, 2001). Estudos utilizando agentes anti-TNF- α claramente mostram que eles podem diminuir ou prevenir a progressão de danos ao osso e cartilagem na AR (Lipsky *et al.*, 2000). Esta atividade envolve provavelmente supressão de osteoclastos em lesões articulares (Redlich *et al.*, 2002).

Tratamentos utilizados na AR

Apesar de ainda não existir uma cura, medicamentos podem melhorar a condição dos pacientes com AR. Quatro principais categorias terapêuticas são usadas no tratamento para AR: drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAID), drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARD), corticosteróides e agentes biológicos.

A primeira linha de tratamento da AR inclui corticosteroides e DMARD e normalmente se inicia pelos fármacos convencionais, como metotrexato, o padrão-ouro dos DMARD (Devine, Alfonso-Cristancho e Sullivan, 2011). Em pacientes com AR moderada a grave que não respondem ao tratamento de primeira linha com DMARD convencionais, a imunoterapia alvo com agentes biológicos é indicada, sendo considerada a segunda linha de tratamento (Malottki e Al., 2011).

Apesar de os agentes biológicos serem uma alternativa para o tratamento da AR, segundo Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (Ministério da Saúde, 2012), os 3 medicamentos biológicos (disponíveis no SUS) para Artrite Reumatóide têm eficácia semelhante, e tem preços que variam de R\$ 616,00 a R\$ 1.217,13 a caixa, o que resulta em um alto custo anual de tratamento. Em relação à segurança, a meta-análise

selecionada mostrou que os biológicos foram associados a taxas significativamente maiores de eventos adversos totais, de abandono devido a eventos adversos, de infecções graves e de reativação de tuberculose, conforme esperado pela natureza imunossupressora destes medicamentos (Ministério da Saúde, 2012). Dessa maneira, vê-se necessidade em desenvolver novas opções de terapias para o tratamento da Artrite Reumatoide, que tenham um valor mais acessível que os agentes biológicos e que sejam mais eficazes que os DMARDs.

Via colinérgica anti-inflamatória

A via colinérgica anti-inflamatória é um mecanismo fisiológico que modula as respostas inflamatórias do hospedeiro através de estimulação do nervo vago (Borovikova *et al.*, 2000; Bernik *et al.*, 2002; Tracey, 2002; Czura e Tracey, 2005). A via é chamada de colinérgica porque a Acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor, e anti-inflamatória, pois macrófagos expostos a esse neurotransmissor são eficientemente inibidos em secretar TNF- α , IL-1 β , HMGB1 e uma série de outros mediadores inflamatórios (Borovikova *et al.*, 2000).

Na via, os sinais aferentes transmitidos pelo nervo vago ativam o reflexo inflamatório resultando em uma estimulação eferente. A ACh liberada pelas terminações sinápticas vagais dentro do sistema retículo-endotelial é capaz de interagir especificamente com subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico acetilcolínico ($\alpha 7nAChR$) de macrófagos, que se localizam nas proximidades. A interação da ACh com o $\alpha 7nAChR$ de macrófagos ocasiona sua desativação, resultando em inibição de secreção de citocinas. Sinais inflamatórios, portanto, são capazes de ativar uma resposta anti-inflamatória que rapidamente previne a produção exacerbada de citocinas inflamatórias (Czura e Tracey, 2005).

Pacientes com AR apresentam diminuição da atividade vagal cardíaca em comparação com os controles normais. Não é sabido se alvos mais distais da via são também afetados, o que poderia ser importante para o delineamento de intervenções terapêuticas (Waldburger *et al.*, 2008). Os resultados encontrados por Van Maanen e colaboradores (2010) sugerem fortemente um papel da via anti-inflamatória colinérgica no desenvolvimento de artrite, que é, pelo menos em parte dependente do $\alpha 7nAChR$.

Waldburger e colaboradores (2008) confirmaram que o $\alpha 7nAChR$ é expresso na membrana sinovial humana de pacientes com AR, e que culturas de FLS retirados de pacientes expressam o receptor de maneira constitutiva, pois a quantidade de receptores manteve-se estável, mesmo quando FLS foram estimulados com citocinas inflamatórias ou foram tratados com ACh.

Em culturas de FLS, a estimulação de $\alpha 7nAChR$ com ACh promoveu a diminuição na produção de quimiocinas e fatores de crescimento em comparação a FLS estimuladas com IL-1. Waldburger e colaboradores (2008) sugerem que a estimulação do $\alpha 7nAChR$ com ACh poderia diminuir o número de neutrófilos e macrófagos infiltrantes na sinóvia.

Os resultados encontrados por Waldburger e colaboradores (2008) utilizando imunohistoquímica sugerem que o $\alpha 7nAChR$ pode estar sendo expresso também em “macrófagos-like” na membrana sinovial, o que corroboraria com Borovikova e col. (2000), que mostraram estas células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) secretam menos TNF- α e IL-1 na presença de um agonista do $\alpha 7nAChR$.

Em conclusão, agonistas do $\alpha 7nAChR$ poderiam potencialmente inibir várias etapas da cascata pró-inflamatória que ocorrem na articulação reumatóide, incluindo a produção de TNF- α , IL-6, bem como o recrutamento de leucócitos.

Bromidrato de Galantamina

A galantamina (figura 3) é um alcaloide extraído do bulbo da espécie vegetal *Galanthus woronowi*, pertencente à família *Amaryllidaceae*. É vendido comercialmente como um medicamento na composição de bromidrato de galantamina, sob o nome de Reminyl®, utilizado no tratamento da doença de Alzheimer. Sua fórmula molecular é $C_{17}H_{21}NO_3$.

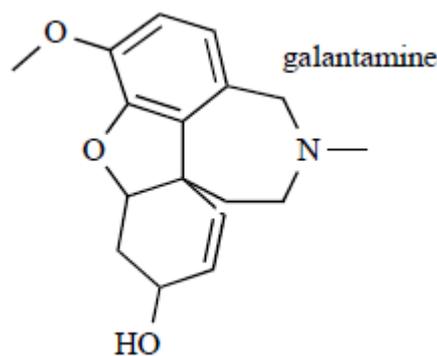


Figura 3- Estrutura molecular da Galantamina

Possui um duplo mecanismo de ação, sendo capaz de modular alostericamente os receptores nicotínicos (Maelicke e Albuquerque, 2000), além de inibir a acetilcolinesterase (AChE), que é uma família de enzimas que catalisam a hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina (ACh).

Galantamina é um potente modulador alostérico positivo de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Schrattenholz *et al.*, 1996), pois concentrações submicromolares de galantamina demonstraram aumentar a frequência de abertura de canais íon nAChR, e, assim, aumentar as respostas provocadas pela ACh (Schrattenholz *et al.*, 1996; Maelicke e Albuquerque, 2000).

A galantamina inibe a degradação da ACh se ligando competitiva e reversivelmente no sítio ativo da AChE (Thomsen *et al.*, 1990; Albuquerque *et al.*, 2001) impedindo a enzima de quebrar a ACh e aumentando os níveis e a duração da ação desse neurotransmissor nas sinapses.

Além de ser utilizado no tratamento contra o Mal de Alzheimer, a galantamina pode ter um papel anti-inflamatório (Pavlov *et al.*, 2009) através da via colinérgica anti-inflamatória, pois é capaz de interagir especificamente com $\alpha 7$ nAChR.

Pavlov e colaboradores (2009) utilizando o modelo de endotoxemia com lipopolissacarídeo (LPS) demonstraram que o bromidrato de galantamina suprimiu o TNF- α sérico e os níveis de IL-6 e melhorou a sobrevivência durante inflamação letal, sendo 4 mg/kg a melhor dose utilizada.

Liu e colaboradores (2010) verificaram que o tratamento com galantamina diminuiu, significativamente, o nível de TNF- α circulante em ratos com peritonite induzida por LPS, demonstrando que o bromidrato de galantamina teve função de regular a resposta inflamatória, e pode ser eficiente no tratamento de doenças inflamatórias. A dose em que Liu e col. obtiveram a melhor inibição de TNF- α foi a de 3mg/kg.

Satpathy e colaboradores (2011) relataram que a administração da galantamina para os ratos com obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura atenua significativamente o estado inflamatório, reduz o peso corporal e a adiposidade abdominal e minimiza a hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, resistência à insulina e acúmulo de gordura no fígado. A dose utilizada nesse estudo foi de 4mg/kg, uma vez ao dia pela via intraperitoneal.

Modelos de estudo em animais

Modelos animais de doenças humanas são ferramentas importantes no estudo da patogênese dessas doenças, e permitem também o estudo e avaliação de possíveis agentes terapêuticos (Kollias *et al.*, 2011). Dentro do estudo experimental da artrite, existe um bom número de modelos animais que em diferentes níveis mimetizam a artrite humana (Hegen *et al.*, 2008; Kollias *et al.*, 2011).

O LPS, que consiste em macromoléculas de parede celular de bactérias gram-negativas, é muito utilizado para estudos de inflamação porque tem participação importante em diversos processos infecciosos, sendo potente estimulador da produção de citocinas por macrófagos e monócitos (Amura *et al.*, 1997).

Para o estudo da artrite reumatoide, a artrite induzida por antígeno se apresenta como um bom modelo de escolha para o estudo da doença, tendo a vantagem de uma reprodutibilidade da duração e curso da inflamação e uma incidência próxima a 100% (Schaible *et al.*, 2010). O antígeno de escolha costuma ser a mBSA (albumina bovina sérica metilada), por ser uma molécula catiônica que é atraída à cartilagem negativamente carregada, ficando retida na articulação (Bendele, 2001). Adicionalmente, esse modelo é uma artrite imunomediada dependente de células T e apresenta características semelhantes à artrite humana, como hiperplasia sinovial, infiltração de células inflamatórias, neoangiogênese, formação de *pannus* e destruição da cartilagem (Ferraccioli *et al.*, 2010).

Modelo de estudo *in vitro*

A migração é uma propriedade fundamental das células vivas e crítica para o desenvolvimento normal e os processos de doença como a metástase do câncer e inflamação. Os métodos para examinar a migração de células são muito úteis e importantes para a pesquisa nas áreas como câncer, imunologia, biologia celular, entre outros (Justus *et al.*, 2014).

Na maioria dos casos de artrite reumatoide, o processo inflamatório afeta inicialmente articulações individuais, mas a doença progride geralmente para afetar quase todas as articulações, mas vias de progressão da doença são em grande parte desconhecidas. FLS têm um papel central no desenvolvimento de hiperplasia sinovial e destruição da articulação na AR (Müller-Ladner *et al.*, 1996; Bartok e Firestein, 2010). (Lefèvre *et al.*, 2009) demonstraram que FLS humanos são capazes de migrar por longas distâncias através da corrente sanguínea em ratos da linhagem SCID para juntar-se e invadir da matriz da cartilagem exposta distante.

Vários métodos podem ser utilizados para estudar a migração e invasão das células em detalhe, mas os ensaios de migração e invasão transwell (figura 4) são amplamente utilizados na comunidade científica (Albini, 1998; Steeg, 2006; Castellone *et al.*, 2011).

O ensaio de invasão “transwell” mede a capacidade de mobilidade e invasão das células para um gradiente quimio-atrativo. Os ensaios de migração e invasão transwell podem

ser usados para analisar a capacidade das células individuais para responder direcionalmente a um quimioatrativo, migrando através de uma barreira física em direção a ele.

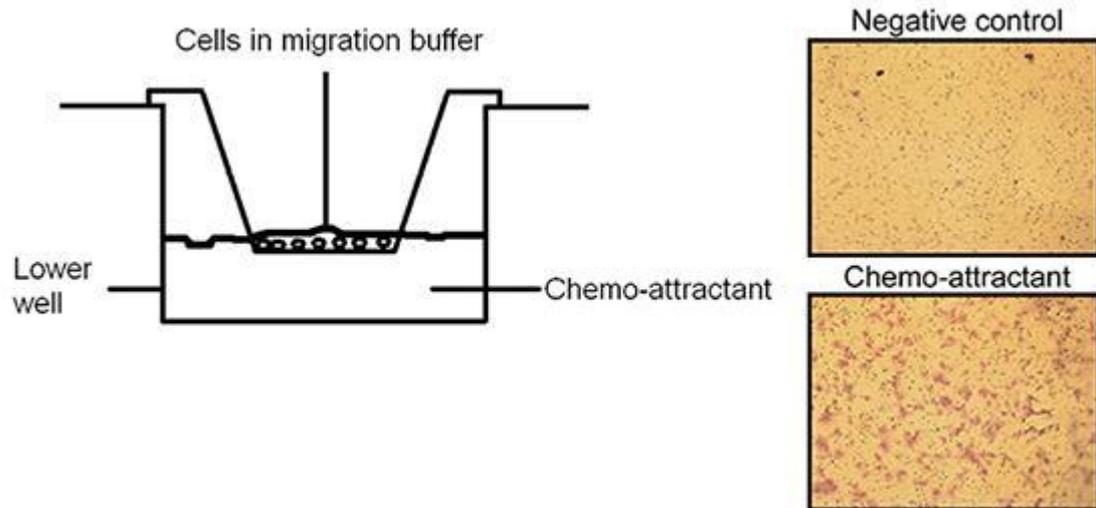


Figura 4 - Esquema do ensaio de invasão utilizando chamber rico em Matrigel, que será o meio utilizado para a invasão da célula. As células são colocadas na porção interna, e migram pelo Matrigel em direção ao quimioatrativo. Quando o chamber é corado com Cristal Violeta, as células que migraram aparecem marcadas no chamber em rosa (imagem direita, primeira de baixo para cima), possibilitando a contagem do número de células que invadiram usando o microscópio. Imagem retirada de Justus e col. (2014)

JUSTIFICATIVA

O alcalóide galantamina, além de já ser utilizado no tratamento contra o Mal de Alzheimer, pode ter um papel anti-inflamatório (Pavlov *et al.*, 2009) através da via colinérgica anti-inflamatória, pois promove a inibição da acetilcolinesterase. Resultados anteriores (Satapathy *et al.*, 2011) demonstraram que o bromidrato de galantamina atenuou significativamente o estado inflamatório em ratos com obesidade induzida.

Esse estudo pretende ampliar o conhecimento sobre o papel anti-inflamatório do bromidrato de galantamina, pois, se comprovado, poderá figurar como uma nova estratégia terapêutica anti-inflamatória.

OBJETIVO

Avaliar a eficácia do bromidrato de galantamina como terapia anti-inflamatória.

Cada etapa do projeto possui objetivos específicos:

(A) Modelo de monoartrite antígeno específico induzido por albumina sérica bovina metilada em camundongos Balb/c: avaliar a nocicepção articular e o infiltrado celular para cavidade articular;

(B) Modelo de peritonite aguda induzida por lipopolissacarídeos em camundongos Balb/c: avaliar o infiltrado celular para cavidade peritoneal;

(C-D) Viabilidade e Invasão de células de fibroblastos sinoviais *in vitro*: quantificar do número de fibroblastos que invadiram o transwell.

MATERIAIS E MÉTODOS

(A) *Indução de monoartrite antígeno específico com albumina sérica bovina metilada (mBSA)*

A técnica foi realizada segundo (Grespan *et al.*, 2008). Os camundongos Balb/c foram divididos em 4 grupos:

- Grupo 1 : animais imunizados, tratados com o veículo do bromidrato de galantamina-salina 0.9% (grupo placebo, n= 8);
- Grupo 2: animais imunizados, tratados com 4 mg/kg bromidrato de galantamina (tratado, n=8);
- Grupo 3: animais imunizados, tratados com 8 mg/kg bromidrato de galantamina (tratado, n=8);
- Grupo 4: animais imunizados, tratados com 1 mg/kg dexametasona (controle positivo de tratamento, n= 9).

Camundongos Balb/c (8 -12 semanas, peso médio 20g) foram sensibilizados através de emulsão de 200 µL pela via subcutânea (s.c.) que contém: 0,1 ml de PBS e 0,1 ml de adjuvante completo de Freund (CFA) e 500 µg de mBSA na primeira semana. O reforço foi administrado 7 e 14 dias após a primeira imunização com mBSA diluído em adjuvante incompleto (IFA). No 21º dia, os animais imunizados foram randomizados entre os quatro grupos e receberão os tratamentos (grupos 2, 3 ou 4) ou salina (grupo 1) pela via intra-peritoneal. Na seqüência foram desafiados com mBSA (10 µg/cavidade) através de injeção intra-articular (i.a., figura 5) (articulação fêmur-tibial) na pata traseira esquerda. O experimento foi finalizado no 22º dia (24h após o desafio e tratamento) com a eutanásia dos animais e coleta do lavado articular utilizando PBS EDTA 1mM da pata que foi desafiada. Este lavado foi utilizado para a contagem total de leucócitos na câmara de Neubauer.

Em todas as etapas os animais foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 2% para manutenção). A indução da artrite e o tratamento dos animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

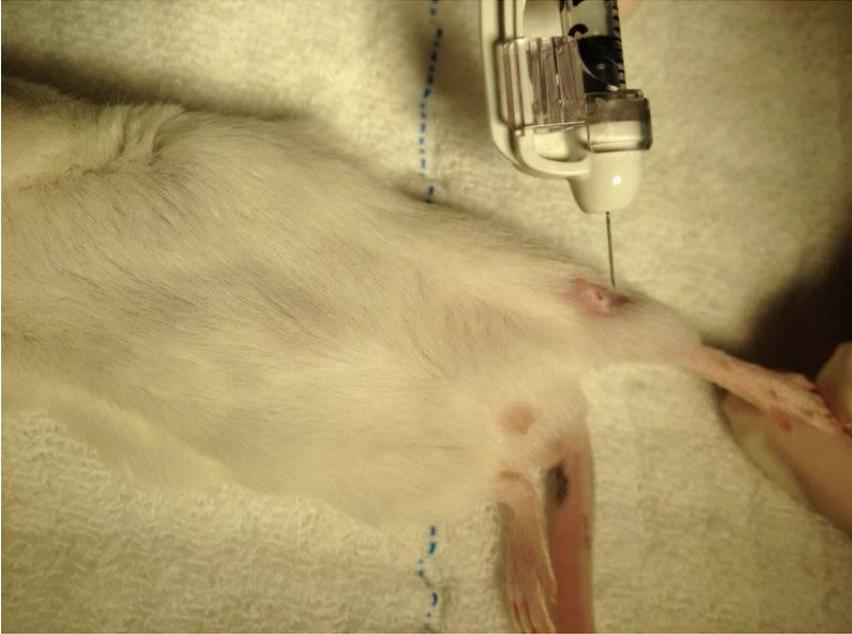


Figura 5 - Desafio intra-articular com mBSA realizado na pata esquerda dos camundongos.

Para a avaliação da nocicepção, os animais foram submetidos a avaliação utilizando filamentos de Von Frey nos tempos 0 (antes do desafio intra-articular), 1h, 3h, 6h e 24h após o desafio, segundo (Cunha *et al.*, 2004). Os camundongos foram colocados sobre uma tela plástica elevada (figura 6) com dimensões 21x27x15 cm, com aberturas de 12x12 mm, recobertos com caixa plástica transparente e, após período de aclimatação, testados com filamentos de nylon de força previamente conhecida (Stoelting Co., Wood Dale, IL, Estados Unidos). O teste consiste em empurrar a pata traseira com pressão crescente para provocar um reflexo de flexão seguido da retirada da pata. Os filamentos foram aplicados perpendicularmente, no centro da planta das patas traseiras do animal, através das aberturas da tela plástica, e a medida da pressão aplicada foi quantificada por anesthesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Sciences Instruments, Califórnia, EUA), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). Quanto maior o valor da pressão exercida na pata antes da sua retirada, menor a nocicepção sentida pelo animal. Em cada tempo, foram realizadas três medidas em cada pata.

Para a análise estatística da nocicepção utilizou-se o modelo de equação de estimação generalizada, onde se compara os diferentes tempos das medições de nocicepção com a pata direita ou esquerda e os diferentes tratamentos. A contagem do número total de células presentes no lavado articular foi analisada estatisticamente utilizando o teste ANOVA.



Figura 6 - Medida da nocicepção sendo realizada utilizando método de Von Frey. O anestesiómetro é aplicado perpendicular à pata do animal, que transmite a pressão realizada até a retirada da pata para um contador digital.

(B) Indução de peritonite por lipopolisacarídeo (LPS)

A técnica foi conduzida segundo anteriormente por (Pavlov *et al.*, 2009). Para este estudo os camundongos Balb/c foram divididos em 4 grupos:

- Grupo 1: animais imunizados, tratados com o veículo do bromidrato de galantamina-salina 0.9% (grupo placebo, n=8);
- Grupo 2: animais imunizados, tratados com 2 mg/kg bromidrato de galantamina (tratado, n=8);
- Grupo 3: animais imunizados, tratados com 4 mg/kg bromidrato de galantamina (tratado, n=8);
- Grupo 4: animais imunizados, tratados com 1 mg/kg dexametasona (controle positivo de tratamento, n=7).

Camundongos Balb/c (8 -12 semanas, peso médio 20g) receberam o tratamento (grupos 2, 3 e 4) ou salina (grupo 1) pela via intraperitoneal no tempo 0 e 18h . Após 30 min, foi administrado i.p. 4 mg/kg de LPS obtido de *Escherichia coli* (Sigma, L6529-1MG). 4 horas após a injeção de LPS os camundongos foram eutanasiados por sobredose de isoflurano. Salina heparinizada (5 mL, 10 U/mL) foi injetada no peritônio. O abdômen foi massageado, e o fluido coletado por uma pequena incisão na cavidade abdominal.

O fluido intraperitoneal coletado foi utilizado para contagem total de leucócitos na câmara de Neubauer e diferencial por citocentrifugação seguida da coloração de Giemsa. Para contagem diferencial, a lâmina é observada no microscópio na objetiva de maior aumento (100x), em imersão. A contagem de células é realizada percorrendo o esfregaço, totalizando a

contagem de 100 células e as diferenciando em neutrófilo, monócito, eosinófilo, linfócito e basófilo.

(C) Viabilidade de fibroblastos tratados com bromidrato de galantamina

Linhagens de fibroblastos sinoviais (*in vitro*) foram tratadas com bromidrato de galantamina para verificar se este possui atividade citotóxica. A viabilidade celular foi realizada segundo previamente por (Oliveira *et al.*, 2011), e avaliada pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB), que se baseia na medição do teor de proteína celular.

Em uma placa de 96 poços, duas linhagens de fibroblastos isolados de camundongos diferentes foram distribuídos com a concentração de 5×10^4 células por poço e encubados (37°C , 5% de CO_2) por um período de 24 h na estufa. No primeiro poço havia somente células, e nos demais as células receberam o bromidrato de galantamina em uma determinada concentração (320 μM , 160 μM , 80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM ou 5 μM), e foram novamente armazenadas por 24h em estufa a 37°C . Após a segunda encubação, as células na placa foram fixadas com ácido tricloroacético 50% e encubadas por 1h a 4°C . A placa foi lavada com água e deixada para secar. A coloração foi feita adicionando SRB 0.4% nos poços e lavando após 30 min com ácido acético 1%. A placa foi novamente deixada para secar. O corante nos poços foi solubilizado com Trizma-base (10mM) e agitado por uma hora na placa. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 565nm.

(D) Invasão de fibroblastos tratados com bromidrato de galantamina

Duas linhagens de fibroblastos sinoviais (*in vitro*) isolados de camundongos diferentes receberam bromidrato de galantamina para avaliar efeito desse fármaco sobre a capacidade de migração celular em comparação com células não tratadas. A concentração do bromidrato de galantamina utilizada foi de 320 μM , selecionada a partir do ensaio de viabilidade dos fibroblastos (descrito item C). Este mesmo ensaio também foi realizado com o medicamento Reminyl, cujo princípio ativo é o bromidrato de galantamina mais excipientes (descritos na bula do medicamento Reminyl), em quatro linhagens de fibroblastos sinoviais isolados de camundongos diferentes.

Para avaliar a invasão dos fibroblastos, foram utilizados chambers de matrigel (matriz de colágeno) BD (Franklin Lakes, NJ, USA). O teste foi realizado de acordo com especificações do fabricante. Quando as células atingiram 70-80% de confluência em cultivo numa garrafa T175, foram desaderidas com tripsina-EDTA. Então, uma concentração de 2×10^5 de células é ressuspendida em meio de cultura sem soro fetal bovino (controle) ou em

meio de cultura sem soro fetal bovino com bromidrato de galantamina (tratamento). A ressuspensão de células é colocada no compartimento interno do chamber de matrigel em um volume de 500 μ l. Nos poços da placa onde o chamber foi colocado, adicionou-se 750 μ l de meio de cultura com de soro fetal bovino (quimioatrativo para as células, pois o soro fetal bovino apresenta nutrientes). A placa com os chambers foi incubada a 37°C por 24 h em uma estufa com 5% de CO₂. O compartimento interno da câmara foi limpo com um swab após ser corado com corante Cristal Violeta por 20 minutos. O número total de células que invadiram a membrana de Matrigel foi contado em um microscópio óptico em aumento de 100x. Os experimentos foram realizados em duplicata.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA) em maio de 2014, sob o número 14-0155.

RESULTADOS

(A) *Indução de monoartrite por albumina sérica bovina metilada (mBSA)*

Os animais utilizados no modelo animal de mBSA foram tratados inicialmente com duas concentrações da galantamina (4 e 8 mg/kg) conforme descrito no material e métodos. Porém, após a primeira dose, verificou-se que os animais que receberam a dose de 8 mg/kg apresentavam muitos efeitos colaterais indesejáveis, tais como: espasmos musculares, diarreia, pelo ouriçado (desconforto geral), apatia, entre outros. Segundo orientação da veterinária, decidiu-se não prosseguir com o estudo utilizando essa dose, e passou-se a administrar somente a dose de 4 mg/kg nesse experimento, e reduzimos as doses para 2 e 4 mg/kg no experimento da peritonite, que foi realizado posteriormente.

As medidas da nocicepção das patas traseiras direita e esquerda dos animais estudados foram realizadas antes do desafio intra-articular com mBSA, que ocorreu na pata esquerda, e 1h, 3h, 6h e 24h após o desafio (tabela 1).

Tabela 1- Média das 3 medidas da nocicepção (pressão realizada em gramas) das patas traseiras direita (D) e esquerda (E) dos camundongos Balb/c com artrite induzida por mBSA utilizando método de Von Frey nos momentos antes do desafio intra-articular, 1h, 3h, 6h e 24h após o desafio.

Tratamento	Número de animais	Antes do desafio		depois do desafio intra-articular							
		D	E	1h		3h		6h		24h	
				D	E	D	E	D	E	D	E
Salina	8	8,57	8,86	8,59	5,15	7,81	5,31	7,92	4,36	8,35	3,79
Dexametasona	9	8,43	8,37	8,23	6,03	8,42	4,19	7,56	4,85	7,44	4,36
Galantamina 4mg/kg	8	7,49	7,87	8,09	5,02	7,33	4,65	6,91	4,31	7,61	4,94

Com o teste estatístico de equação de estimação generalizada obteve-se $p=0,001$ para todas as comparações (figura 7). As comparações consideradas significativas ($p<0,05$) foram salientadas na tabela 1 do apêndice.

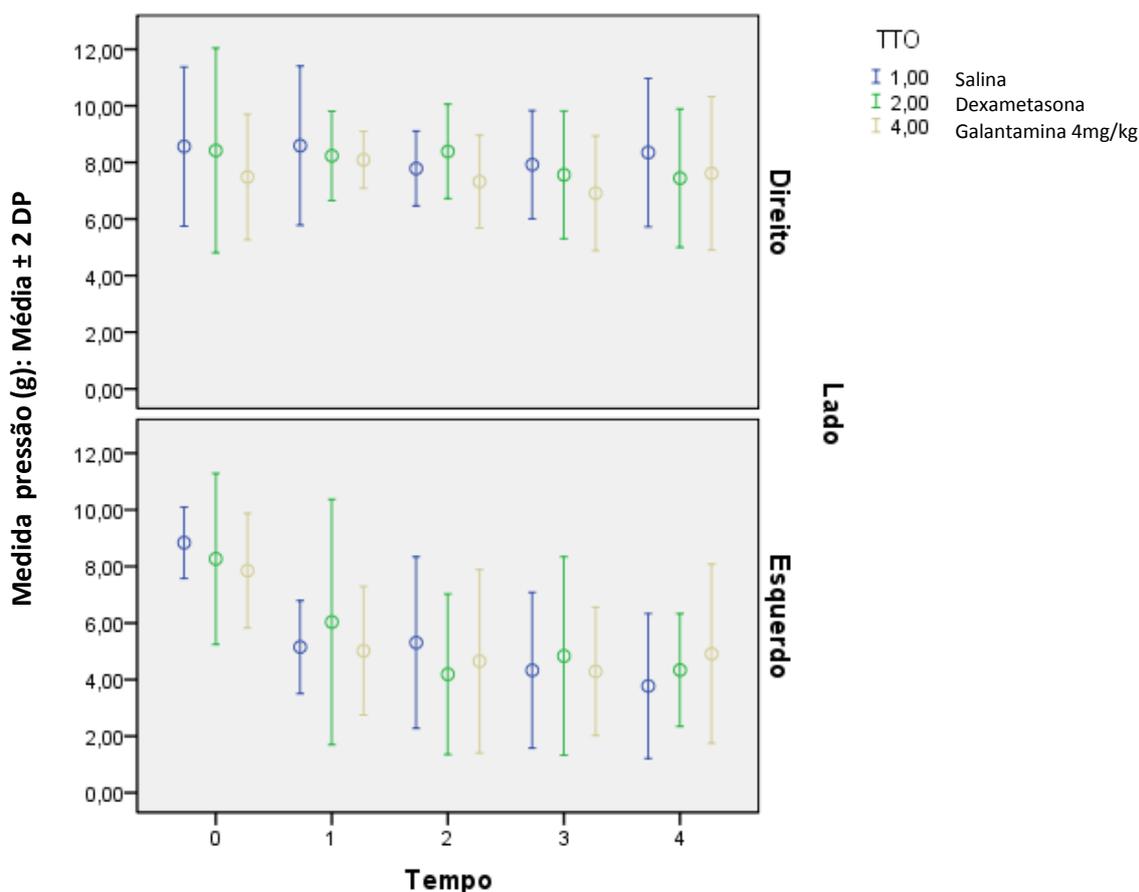


Figura 7 - Medida da nocicepção das patas traseiras (lado esquerdo e direito) dos camundongos Balb/c com artrite induzida por mBSA utilizando método de Von Frey nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4, que correspondem respectivamente a antes do desafio intra-articular, 1h, 3h, 6h e 24h após o desafio. Os círculos correspondem ao valor da nocicepção média do grupo em questão, e as barras correspondem a dois desvios padrão da média. A pata esquerda foi a desafiada com mBSA. Quanto menor o valor de pressão medido pelo aparelho, maior é nocicepção do animal avaliado.

Analisando a figura 7 e a figura 1 do apêndice obtém-se que:

- A medida da nocicepção da pata esquerda (desafiada) dos animais diferencia-se da direita após o desafio intra-articular, pois a nocicepção na pata desafiada é geralmente maior e aumenta com o tempo em comparação com a pata não-desafiada, que permanece com a nocicepção constante.
- A medida da nocicepção na pata direita não apresenta diferença significativa em comparação a ela mesma em qualquer tratamento e tempo. A medida da nocicepção da pata esquerda em comparação com ela mesma, em geral, só apresenta diferença significativa no tempo zero em relação aos demais tempos, isto é, antes e após o desafio. Esse resultado é visível na figura 7, pois podemos perceber que a nocicepção aumenta após o desafio.
- Os animais tratados com dexametasona e bromidrato de galantamina não apresentaram diferença na nocicepção em comparação ao grupo placebo (salina).

A contagem do total de células presentes no líquido sinovial da pata desafiada está na tabela 2. A análise foi realizada utilizando o teste ANOVA com valor de $p=0,939$.

Tabela 2 - Média da contagem total de células presentes no líquido sinovial da pata que recebeu o desafio intra-articular com mBSA.

Tratamento	Número de animais	Média da contagem celular ($\times 10^4$)
Salina	8	158,00
Dexametasona	9	145,00
Galantamina 4mg/kg	8	161,00

(B) Indução de peritonite por lipopolisacarídeo (LPS)

A contagem do número total de células presentes no lavado peritoneal (tabela 3), apresentou $p=0,139$ usando ANOVA. Analisando a figura 8, percebe-se que, nos grupos que receberam tratamento, há uma tendência de diminuição do número de células presentes no lavado peritoneal, que não é estatisticamente comprovada.

A análise diferencial das células presentes no lavado peritoneal apresentou $p=0,023$, e a diferença significativa está no número de monócitos presentes no grupo de animais tratados com galantamina 2mg/kg, que foi significativamente menor que o número de monócitos do grupo tratado com galantamina 4mg/kg.

Tabela 3- Resultado da contagem total e diferencial das células presentes no lavado peritoneal dos camundongos com peritonite induzida por LPS, no diferentes grupos de tratamento. Eosi = Eosinófilo; Neu = Neutrófilo; Lin = Linfócito; Mon = Monócito.

Tratamento	Contagem total das células ($\times 10^4$)		Contagem diferencial das células			
	Total	Basófilo	Eosi	Neu	Lin	Mon
	1265					
	168	1	0	8	67	24
	494	1	0	3	60	36
Salina	145	3	0	0	57	40
	238	0	0	4	51	45
	502	0	0	44	29	27
	419	1	0	3	60	36
	256	1	0	6	61	32
Média	435,81	1	0	9,7	55	34,3

Desvio Padrão	363,25					
	211	0	0	2	71	27
	174	1	0	0	59	40
	131	3	0	20	46	31
Dexametasona	194	1	0	0	55	44
	203	0	0	0	55	45
	299	3	0	7	62	28
	298	3	1	2	64	30
Média	215,64	1,6	0,1	4,4	58,8	35
Desvio Padrão	62,34					
	173	1	0	28	57	14
	372					
	304	1	0	14	63	22
Galantamina 2mg/kg	306	6	0	15	62	17
	284	4	1	1	62	32
	204	0	0	5	63	32
	209	1	0	0	57	42
	254	0	0	6	71	23
Média	263,19	1,8	0,1	9,8	62,1	26
Desvio Padrão	66,00					
	374	1	0	21	36	42
	128	1	0	12	42	45
	250					
Galantamina 4mg/kg	101					
	151	0	0	14	47	39
	277	0	0	2	66	32
	182	2	0	1	59	38
	270	1	0	5	56	38
Média	216,63	0,8	0	9,1	51	39
Desvio Padrão	91,89					

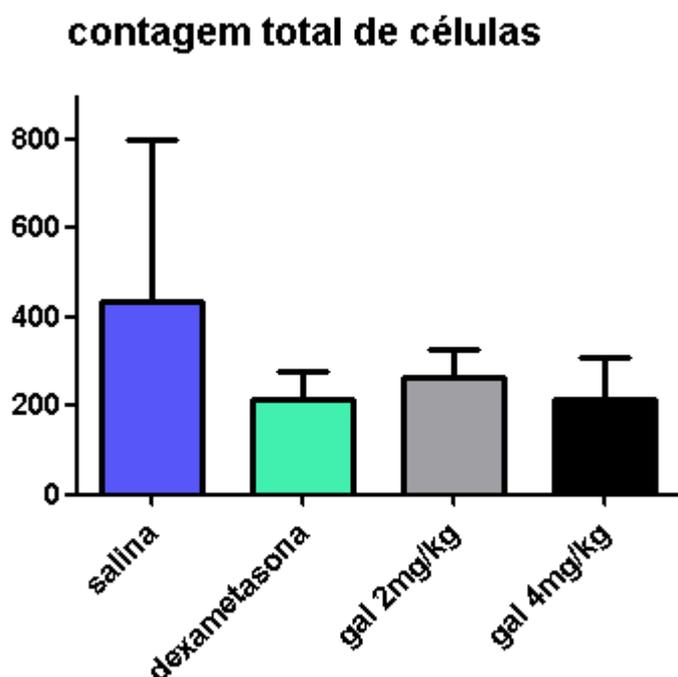


Figura 8 - Média e desvio padrão da contagem em Câmara de Neubauer do total de células presentes no lavado peritoneal dos camundongos com peritonite induzida por LPS, no diferentes grupos de tratamento: Salina (n=8, DP=363,25), Dexametasona (n=7, DP=62,34), Galantamina 2mg/kg (n=8, DP=66,00) e Galantamina 4mg/kg (n=8, DP=91,89).

(C) Viabilidade de fibroblastos tratados com bromidrato de galantamina

A viabilidade foi testada em duas culturas de fibroblastos isolados de camundongos diferentes nas concentrações de bromidrato de galantamina e Reminyl de 320 μ M, 160 μ M, 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M e 5 μ M. Verificou-se que nenhuma das concentrações testadas foram citotóxicas para as células de fibroblastos. Sendo assim, utilizou-se a concentração mais alta testada (320 μ M) no experimento de invasão de fibroblastos (item D).

(D) Invasão de fibroblastos tratados com bromidrato de galantamina

Todas as duplicatas das linhagens de fibroblastos tratadas com Reminyl ou bromidrato de galantamina tiveram diminuição na quantidade média de células invasoras em comparação a média da duplicata da mesma linhagem que não recebeu tratamento (figura 9 e 10). A porcentagem de diminuição da invasão dos fibroblastos foi calculada comparando-se a média da duplicata sem tratamento com a média da duplicata com tratamento, e variou de 11,53% a 31,81% nas invasões tratadas com Reminyl e 23,12% a 35,41% nas tratadas com bromidrato de galantamina (tabela 4).

Invasão de fibroblastos

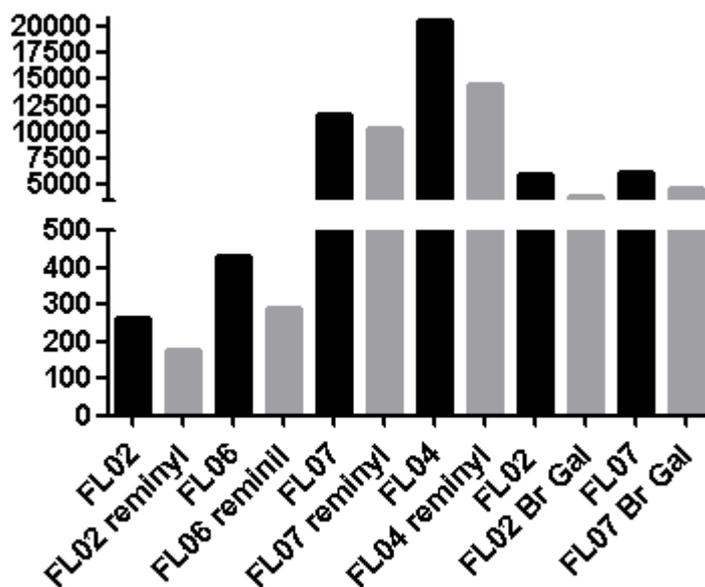


Figura 9 - Resultado da invasão de fibroblastos utilizando as linhagens (FLs) 02, 04, 06 e 07. As barras entititulasdas por FL02, FL06, FL07e FL04 representam a média das duplicatas que não receberam tratamento. As demais barras representam a média das duplicatas que receberam tratamento (Reminyl ou bromidrato de galantamina).

Treatment	Lineage	Received treatment	Mean of duplicate	% of reduction
Reminyl	FL02	-	261	
		✓	179	31,61
	FL04	-	20553	
		✓	14591	29,01
	FL06	-	428	
		✓	292	31,81
FL07	-	11613		
	✓	10274	11,53	
Bromidrato de Galantamina	FL02	-	5937	
		✓	3835	35,41
	FL07	-	6146	
		✓	4725	23,12

Tabela 4 - Resultado da invasão de fibroblastos utilizando as linhagens (FLs) dos animais 02, 04, 06 e 07, com ou sem tratamento, utilizando Reminyl ou bromidrato de galantamina.

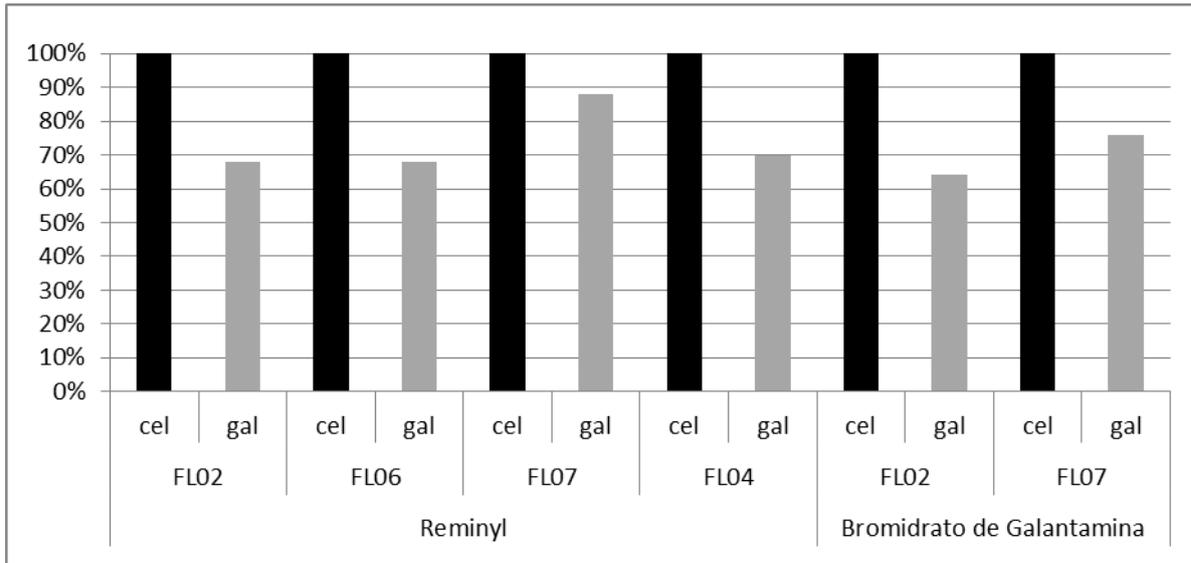


Figura 10 - Resultado da invasão de fibroblastos utilizando as linhagens (FLs) 02, 04, 06 e 07. As barras entititadas pretas representam a porcentagem da média das duplicatas que não receberam tratamento. As barras cinza representam a porcentagem média das duplicatas que receberam tratamento (Reminyl ou bromidrato de galantamina). Os valores foram calculados comparando-se a porcentagem da média da duplicata que não recebeu tratamento (100%) em relação a porcentagem da média da duplicata que recebeu tratamento (porcentagem de células que migraram).

DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o uso de uma molécula que, segundo alguns autores (Pavlov *et al.*, 2009; Satapathy *et al.*, 2011), poderia ter uma atividade anti-inflamatória. O bromidrato de galantamina foi utilizado como tratamento em um experimento com cultura celular e em dois modelos de estudo em animais. Como o nosso grupo de pesquisa é voltado para o estudo de doenças reumáticas e já existem vários modelos de doença em animais que estão bem estabelecidos em nosso laboratório, essa molécula foi também testada frente a um potencial uso contra a artrite reumatoide.

No experimento com artrite induzida por mBSA, testamos a capacidade do bromidrato de galantamina diminuir a nocicepção e o infiltrado de células para a cavidade articular através de uma artrite induzida por antígeno. Ao compararmos os valores de nocicepção obtidos na análise estatística, apesar de obtermos um valor de p significativo ao avaliarmos esse parâmetro em todos os tempos, tratamentos e patas, ao observar o gráfico, podemos perceber que na pata desafiada, ao longo dos tempos, a nocicepção parece não diferir entre os tratamentos (figura 7). Logo, devemos observar onde as diferenças estão. Para isso avaliamos os valores de p individuais para poder concluir a que variável (tempo/pata/tratamento) se deve o valor significativo de p. Para essa análise foi montada uma tabela, que se encontra no apêndice, através dela podemos afirmar que:

- A medida da nocicepção na pata direita não apresenta diferença significativa em comparação a ela mesma em qualquer tratamento e tempo. Isso se deve ao fato de a pata direita não ter sido desafiada, e permanecer, portanto, com a nocicepção sem alteração significativa durante os tempos e tratamentos.

- A medida da nocicepção da pata esquerda em comparação com ela mesma, em geral, só apresenta diferença significativa no tempo zero (antes do desafio) em relação aos demais tempos (depois do desafio). Assim, podemos concluir que os tratamentos com galantamina ou dexametasona não modificaram a nocicepção em comparação a salina dentro dos mesmos tempos.

- Ao compararmos a pata esquerda com a pata direita percebemos, em geral, que: após o desafio, essa diferencia-se daquela a medida que o tempo avança. Assim, podemos perceber que a artrite induzida por antígeno foi capaz de causar a doença, pois a nocicepção na pata desafiada é geralmente maior e aumenta com o tempo em comparação com a pata não-desafiada, que permanece com a nocicepção constante.

Na contagem de células presentes no lavado intra-articular, não houve diferença significativa entre os tratamentos, o que corrobora com o resultado encontrado na nocicepção. A dexametasona é um anti-inflamatório corticoesteróide é utilizada em outros estudos como controle positivo de tratamento. Grespan e colaboradores (2008), observou que a migração de neutrófilos induzida por mBSA em camundongos imunizados foi inibida com o uso de dexametasona. (Baschant *et al.*, 2011) também imunizaram camundongos com mBSA e trataram com dexametasona, e estes apresentaram articulações com infiltrado celular e inflamação sinovial reduzidas, resultando em um escore histopatológico menor em comparação ao grupo não tratado.

Cabe salientar que, a articulação de um camundongo é pequena e, ao inserir o líquido para o lavado, sua coleta torna-se difícil, provocando eventuais perdas de líquido e consequentemente células infiltradas, influenciando o resultado do teste e inserindo um viés ao estudo.

Podemos concluir com a experimentação do mBSA que houve diferença de nocicepção da pata desafiada em relação a não-desafiada, que os tratamentos não apresentaram diferença significativa de nocicepção em relação a salina nos mesmos tempos na pata desafiada, e que o infiltrado celular no líquido intra-articular não diferiu entre os tratamentos.

No experimento de peritonite induzida por LPS, tínhamos por objetivo avaliar se o tratamento bromidrato de galantamina seria capaz de diminuir o infiltrado celular para a cavidade abdominal. Analisamos as células presentes no líquido peritoneal e, comparando com a literatura (Shelton, Daves e Hemmer, 1970), observamos que:

- Os animais tratados com dexametasona, bromidrato de galantamina 2 e 4 mg/kg tiveram a média da quantidade total de células próxima da normalmente encontrada em camundongos Balb/c machos de mesma idade. Já a média da quantidade de células totais do grupo salina pareceu ser maior, mas a diferença estatística não pode ser verificada, pois o grupo salina apresentou um desvio padrão muito grande.

- Ao ser comparado o perfil leucocitário presente no lavado articular dos diferentes grupos de tratamento, obteve-se valor de p significativo. Analisando esse resultado, a diferença encontra-se no número de monócitos presente nos animais tratados com galantamina 2mg/kg, que foi significativamente diferente do número de monócitos dos animais tratados com galantamina 4 mg/kg. Com isso, podemos perceber que a dexametasona,

utilizada no experimento como controle positivo de tratamento, não mudou o perfil leucocitário em relação aos animais do grupo placebo (salina). Da mesma maneira, os animais tratados com bromidrato de galantamina nas duas concentrações também não tiveram perfil leucocitário modificado em relação ao grupo placebo.

Nossos resultados diferem de trabalhos anteriores que também induziram inflamação utilizando LPS e realizaram tratamento com bromidrato de galantamina. Pavlov e col. e Liu e col. demonstraram que o bromidrato de galantamina diminui o nível de TNF sérico, utilizando a dose de 4mg/kg e 3mg/kg, respectivamente. Esperava-se que, se os níveis de TNF diminuíssem, observaríamos no nosso estudo diferenças significativas de migração celular para o peritônio entre animais tratados com bromidrato de galantamina e placebo, já que essa citocina promove a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção (Storey, Comer e Scott, 1994).

O bromidrato de galantamina não apresentou citotoxicidade até a máxima concentração testada (320µM) nas duas linhagens de fibroblastos isoladas de camundongo no período de 24h. Esse resultado era esperado, pois o Reminyl, cujo princípio ativo é o bromidrato de galantamina, é um medicamento já comercializado para Alzheimer.

No modelo de invasão utilizando fibroblastos isolados da cartilagem sinovial dos camundongos, houve diminuição de 11, 53% a 35,41% na média geral da quantidade de células invasoras tratadas com Reminyl ou bromidrato de galantamina. O processo de invasão dos tecidos pelos FLS é importante para a AR acometer várias articulações (Lefèvre *et al.*, 2009), sendo assim, sua diminuição é importante para que, no início da doença, a inflamação não atinja várias articulações. Resultados anteriores mostraram que, o potencial invasor *in vitro* de FLS através Matrigel correlacionam-se com alterações erosivas radiográficas e com lesões articulares histológicas em pacientes com AR e em ratos com artrite induzida por pristane (Tolboom *et al.*, 2005; Laragione *et al.*, 2008). Sendo assim um bom preditor da atividade anti-reumática de um fármaco.

Como conclusão geral deste trabalho temos que: o bromidrato de galantamina reduziu a invasão das células na experimentação *in vitro*, no entanto não reduziu a dor nem o infiltrado celular no experimento do mBSA, bem como a dexametasona. No experimento peritonite, o número médio de células presentes no líquido peritoneal foi maior na salina em relação aos outros tratamentos, mas não estatisticamente significante devido ao desvio padrão

alto do grupo salina. Mais estudos precisam ser feitos para que o papel anti-inflamatório e possível uso frente à artrite reumatóide do bromidrato de galantamina seja confirmada.

Como perspectivas para esse estudo, entendemos que é necessário repetir o modelo de peritonite, para obtermos um desvio padrão menor no grupo de animais placebo (salina), a fim de observar realmente se há ou não efeito do tratamento dos animais com bromidrato de galantamina. Também pretendemos testar o uso do bromidrato de galantamina no modelo animal de artrite induzida por colágeno (CIA), que consiste numa poliartrite que atinge as articulações das patas do camundongo. É necessário realizar o modelo de invasão com mais linhagens celulares de fibroblastos sinoviais, para aumentar o número amostral desse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. **Cellular and Molecular Immunology**. 6°. 2003.

ALBINI, A. Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms. **Pathol Oncol Res**, v. 4, n. 3, p. 230-41, 1998. ISSN 1219-4956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761943> >.

ALBUQUERQUE, E. X. et al. Modulation of nicotinic receptor activity in the central nervous system: a novel approach to the treatment of Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 15 Suppl 1, p. S19-25, Aug 2001. ISSN 0893-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11669505> >.

AMURA, C. R. et al. Two functionally independent pathways for lipopolysaccharide-dependent activation of mouse peritoneal macrophages. **J Immunol**, v. 159, n. 10, p. 5079-83, Nov 1997. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9366436> >.

ANDREOLI, T. E.; BENNETT, J. C. **Medicina Interna Básica**. 4a ed. 1998.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunol Rev**, v. 233, n. 1, p. 233-55, Jan 2010. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193003> >.

BASCHANT, U. et al. Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 48, p. 19317-22, Nov 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084093> >.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 1, n. 4, p. 377-85, Jun 2001. ISSN 1108-7161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758488> >.

BERNIK, T. R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Exp Med**, v. 195, n. 6, p. 781-8, Mar 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901203> >.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-62, May 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839541> >.

BRENOL, C. V. et al. [Rheumatoid arthritis and atherosclerosis]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 5, p. 465-70, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952359> >.

BURMESTER, G. R.; FEIST, E.; DÖRNER, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 2, p. 77-88, Feb 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217582> >.

CAOLA, G. The anatomy and physiology of diarthroses. **Vet Res Commun**, v. 27 Suppl 1, p. 69-73, Sep 2003. ISSN 0165-7380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14535371> >.

CASTELLONE, R. D. et al. Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. **Cancer Lett**, v. 312, n. 2, p. 197-208, Dec 2011. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917373> >.

CRUVINEL, W. M. et al. **Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. Rev. Bras. Reumatol. 50(4): 434-61 p. 2010.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 401-7, Mar 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060710> >.

CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. **J Intern Med**, v. 257, n. 2, p. 156-66, Feb 2005. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15656874> >.

DEVINE, E. B.; ALFONSO-CRISTANCHO, R.; SULLIVAN, S. D. Effectiveness of biologic therapies for rheumatoid arthritis: an indirect comparisons approach. **Pharmacotherapy**, v. 31, n. 1, p. 39-51, Jan 2011. ISSN 1875-9114. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182357> >.

DÖRNER, T.; BURMESTER, G. R. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. **Curr Opin Rheumatol**, v. 15, n. 3, p. 246-52, May 2003. ISSN 1040-8711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707577> >.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 163-96, 2001. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244034> >.

FERRACCIOLI, G. et al. Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. **Mol Med**, v. 16, n. 11-12, p. 552-7, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683549> >.

FIRESTEIN, G. **Evolving concepts of rheumatoid arthritis**. Nature. 423(6937): 356-61 p. 2003.

GRESPLAN, R. et al. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 7, p. 2030-40, 2008.

HEGEN, M. et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 11, p. 1505-15, Nov 2008. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055474> >.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. n. 88, p. e51046, 2014/06/01/ 2014. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.jove.com/video/51046> >.

KINNE, R. W. et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2000. ISSN 1465-9905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094428> >.

KOLLIAS, G. et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 8, p. 1357-62, Aug 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628308> >.

KUIPER, J. J.; VAN BUUREN, H. R.; DE MAN, R. A. Ascites in cirrhosis: a review of management and complications. **Neth J Med**, v. 65, n. 8, p. 283-8, Sep 2007. ISSN 0300-2977. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890787> >.

LARAGIONE, T. et al. The arthritis severity locus Cia5d is a novel genetic regulator of the invasive properties of synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 8, p. 2296-306, Aug 2008. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668563> >.

LEFÈVRE, S. et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. **Nat Med**, v. 15, n. 12, p. 1414-20, Dec 2009. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898488> >.

LIPSKY, P. E. et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. **N Engl J Med**, v. 343, n. 22, p. 1594-602, Nov 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11096166> >.

LIU, Z. H. et al. Effect of cholinesterase inhibitor galanthamine on circulating tumor necrosis factor alpha in rats with lipopolysaccharide-induced peritonitis. **Chin Med J (Engl)**, v. 123, n. 13, p. 1727-30, Jul 2010. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819637> >.

MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E. X. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol**, v. 393, n. 1-3, p. 165-70, Mar 2000. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771010> >.

MALOTTKI, K.; AL., E. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess**, v. 15, n. 14, p. 1-278, 2011.

MARGETTS, P. J.; BRIMBLE, K. S. Peritoneal dialysis, membranes and beyond. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 15, n. 6, p. 571-6, Nov 2006. ISSN 1062-4821. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053469> >.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752> >.

MIOSSEC, P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 16, n. 3, p. 218-22, May 2004. ISSN 1040-8711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103248> >.

MUTSAERS, S. E. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. **Respirology**, v. 7, n. 3, p. 171-91, Sep 2002. ISSN 1323-7799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12153683> >.

MÜLLER-LADNER, U. et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. **Am J Pathol**, v. 149, n. 5, p. 1607-15, Nov 1996. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8909250> >.

OLIVEIRA, P. G. et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 10, p. 2956-65, Oct 2011. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953084> >.

PAVLOV, V. A. et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 1, p. 41-5, Jan 2009. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639629> >.

REDLICH, K. et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. **J Clin Invest**, v. 110, n. 10, p. 1419-27, Nov 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438440> >.

SATAPATHY, S. K. et al. Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. **Mol Med**, v. 17, n. 7-8, p. 599-606, 2011. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738953> >.

SCHAIBLE, H. G. et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1193, p. 60-9, Apr 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398009> >.

SCHRATTENHOLZ, A. et al. Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. **Mol Pharmacol**, v. 49, n. 1, p. 1-6, Jan 1996. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8569694> >.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094-108, Sep 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870100> >.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol**, v. 31, n. 3, p. 594-7, Mar 2004. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994410> >.

SHELTON, E.; DAVES, S.; HEMMER, R. Quantitation of strain BALB-c mouse peritoneal cells. **Science**, v. 168, n. 3936, p. 1232-4, Jun 1970. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5445614> >.

SHELTON, E.; RICE, M. E. Growth of normal peritoneal cells in diffusion chambers: a study in cell modulation. **Am J Anat**, v. 105, p. 281-341, Nov 1959. ISSN 0002-9106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14445796> >.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nat Med**, v. 12, n. 8, p. 895-904, Aug 2006. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892035> >.

STOREY, G. O.; COMER, M.; SCOTT, D. L. Chronic arthritis before 1876: early British cases suggesting rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 53, n. 9, p. 557-60, Sep 1994. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979591> >.

STRASINGER, S. **Uroanálise e fluidos biológicos**. 3a ed. 2000.

THOMSEN, T. et al. Stereoselectivity of cholinesterase inhibition by galanthamine and tolerance in humans. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 39, n. 6, p. 603-5, 1990. ISSN 0031-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2095347> >.

TOLBOOM, T. C. et al. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 7, p. 1999-2002, Jul 2005. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15986342> >.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-9, 2002 Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490958> >.

VAN MAANEN, M. A. et al. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p. 1717-23, Sep 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511609> >.

WALDBURGER, J. M. et al. Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the $\alpha 7$ nicotinic receptor. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 11, p. 3439-49, Nov 2008. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18975306> >.

	dex	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		
	gal	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x			x	x	x		
Tempo 4	direita																						
	sal								x		x				x				x			x	
	dex								x						x				x			x	
	gal								x						x				x			x	
	esquerda																						
	sal	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x						x	x	x		
	dex	x	x	x	x	x	x	x			x	x							x	x	x		
	gal	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x						x	x	x		

