

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Desenvolvimento e Teste de Liberação Transdérmica do
Dinitrato de Guaifenesina**

Drielly Cristina Braite

Pelotas, 2014

Drielly Cristina Braite

Desenvolvimento e Teste de Liberação Transdérmica do Dinitrato de Guaifenesina

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof. Dra. Judy Anderson, Ph.D.

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Sibeles Borsuk

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B814d Braite, Drielly Cristina

Desenvolvimento e teste de liberação transdérmica do dinitrato de guaifenesina / Drielly Cristina Braite. – 42f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientadora Sibeles Borsuk.

1.Biotecnologia. 2.Dinitrato de guaifenesina. 3.Miogênese. 4.Células satélites. 5.Óxido nítrico. I.Borsuk, Sibeles. II.Título.

BANCA EXAMINADORA

Ma. Angela Sena, Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Lucielli Savegnago, Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Sibeles Borsuk, Universidade Federal de Pelotas (Orientadora acadêmica)

“Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais e ao meu irmão. Sem eles, não teria chegado até aqui”.

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de expressar meu sincero agradecimento ao Programa Ciência sem Fronteiras, aonde tive a oportunidade de morar no Canadá durante 16 meses com subsídios do governo brasileiro, mais especificamente do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Essa experiência não só impactou ao meu crescimento acadêmico e profissional, como pessoal.

Em um segundo momento, mas não menos importantes, gostaria de agradecer aos meus orientadores do Canadá, Judy Anderson e Frank Burczynski. Obrigada por serem pacientes comigo durante todos os 12 meses de trabalho desenvolvido em seus respectivos laboratórios. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de realizar o estágio final e trabalho de conclusão de curso. Serei eternamente grata por toda oportunidade e por ter vocês como grandes inspirações e modelo na minha carreira acadêmica-científica. Obrigada por me proporcionarem conhecimento, motivação, entusiasmo e por serem tão incríveis.

Aos colegas de laboratório no Canadá: Arun Yadav, Casey Sayre, Deanna Gigliotti, Dennis Cote, Helia (Haoyue) Zhang, Ivy (Siyan) Wang, Jeremias Yarmie, Sarah Montiel Gomes Eloi, Stephanie Martinez, Ted Lakowski e Victor Perez; muito obrigada!

À Profa. Dra. Sibeles Borsuk por ter participado do início da minha carreira acadêmica, como orientadora de Iniciação Científica, e por ter aceitado o convite para orientação acadêmica do presente trabalho de conclusão de curso. Muito obrigada pela brilhante orientação, aprendizagem, confiança e por todo carinho. Serei eternamente grata!

Também gostaria de expressar meu carinho e agradecimento à Profa. Dra. Lucielli Savegnago e à Ma. Angela Sena, por terem aceitado participar da banca examinadora do presente trabalho de conclusão de curso.

Aos professores da UFPel muito obrigada por toda experiência e por influenciarem amplamente para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos amigos que de alguma forma sempre estiveram presentes, sejam eles de Pelotas, Sorocaba e mundo a fora; muito obrigada por sempre me incentivarem a continuar e nunca desistir.

Gostaria de agradecer as pessoas mais importantes da minha vida, minha família. Em especial aos meus pais amados (Sonia de Assis Braite e Wilson Roberto Braite), ao meu querido irmão (Éwerton Braite) e as minhas avós (Marlene de Oliveira Vieira e Luzia Sacheti Braite) pelo carinho, amor e confiança. Sem vocês nada disso seria possível. Se hoje eu cheguei até aqui, foi porque vocês existem (existiram). Muito obrigada!

Muito obrigada a todos que de alguma forma participaram dessa jornada!

Resumo

BRAITE, Drielly Cristina. **Desenvolvimento e Teste de Liberação Transdérmica do Dinitrato de Guaifenesina**. 2014. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

O dinitrato de Guaifenesina (1,2-di-O-nitro-3-(o-metoxifenoxi) – propanediol) é um novo regenerador de músculo esquelético formulado e primeiramente sintetizado por Wang, Anderson e Burczynski em 2009 na University of Manitoba, Canadá. Trabalhos anteriores demonstraram que esta molécula é capaz de ativar as células satélites para iniciar o processo de miogênese pela doação de óxido nítrico (NO) para o músculo esquelético. Isso promove novas células precursoras para o crescimento e reparo do músculo esquelético após lesão ou doença. O objetivo deste trabalho foi sintetizar, purificar e caracterizar o fármaco Dinitrato de Guaifenesina e realizar ensaios transdérmicos a partir do método de células de *Franz* com a finalidade de desenvolver e entregar NO para o músculo esquelético. A síntese do fármaco Dinitrato de Guaifenesina foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na adição de guaiacol com brometo de alila e carbonato de potássio. Na segunda reação, ao primeiro produto foram adicionados iodo e nitrato de prata. Ambas as reações foram monitoradas pela técnica de cromatografia em camada delgada e concentradas por destilador a vácuo para eliminar a presença de qualquer líquido volátil. A purificação foi realizada a partir da cromatografia em coluna com adsorvente sílica gel e sistema de solvente hexano e acetato de etila (9:1). A técnica de CLAE foi utilizada para identificar e caracterizar o produto final, Dinitrato de Guaifenesina. O método de células de Franz foi utilizado nos ensaios transdérmicos do fármaco Guaifenesina Dinitrato em óleo de canola 1%, a fim de avaliar a interação entre o fármaco e a proteína. A análise por CLAE foi realizada para identificar o tempo de eluição do Dinitrato de Guaifenesina e detectar picos de outras substâncias. O tempo de eluição do Dinitrato de Guaifenesina foi analisado com o solvente acetonitrila e metanol em diversas concentrações, injeções e fluxos totais. A identidade e a caracterização do Dinitrato de Guaifenesina foram confirmadas a partir da técnica de CLAE. O solvente acetonitrila 60% em água mostrou ser uma boa opção para fase móvel. Ensaios transdérmicos demonstraram uma forte ligação entre o fármaco e o veículo, o que pode ter prejudicado a interação entre fármaco-proteína. O desenvolvimento de um novo medicamento capaz de proporcionar NO ao músculo esquelético é uma abordagem que inovou ao ativar as células satélites e crescimento celular do músculo esquelético. A entrega de NO para o músculo esquelético pode manter a função normal muscular e proporcionar o tratamento para doenças neuromusculares. Mais estudos transdérmicos são necessários antes da validação do uso tópico do Dinitrato de Guaifenesina.

Palavras-chave: Dinitrato de Guaifenesina; miogênese; células satélites; óxido nítrico.

Abstract

BRAITE, Drielly Cristina. **Development and Transdermal-flux studies of Guaifenesin Dinitrate**. 2014. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Guaifenesin Dinitrate (1,2-di-O-nitro-3-(o-methoxyphenoxy) - propanediol) is a novel skeletal muscle regenerator formulated and first synthesized by Wang, Anderson and Burczynski in 2009 at University of Manitoba, Canada. Previous work has shown that is capable of activating satellite cells to initiate the myogenesis process for delivering nitric oxide (NO) to skeletal muscle. It provides new precursor cells for skeletal muscle growth and muscle repair from injury or disease. The aim was synthesize, purify and characterize Guaifenesin Dinitrate and transdermal flux studies by using *Franz* diffusion cells in order to develop and delivery NO for skeletal muscle. Guaifenesin Dinitrate was synthesized using a two step reaction. The first step involved the addition of guaiacol, allyl bromide and potassium carbonate in acetone. The second reaction involved reacting the product obtained with iodine and silver nitrate. Both reactions were monitored by thin layer chromatography and concentrated by vacuum distillation to extract any volatile liquids. Purification was by column chromatography using silica gel in hexane/ethyl acetate (9:1). HPLC analyses was used to identify and characterize Guaifenesin Dinitrate. *Franz* diffusion cells were used to evaluate the transdermal flux of Guaifenesin Dinitrate from a 1% canola oil vehicle in order to test the interaction between the drug-protein. HPLC analyses were made to identify when the Guaifenesin Dinitrate peak eluted and to detect peaks from other substances. The elution time for Guaifenesin Dinitrate was analyzed at different acetonitrile and methanol concentrations and injection-flow rates. Acetonitrile at 60% in water as the mobile phase proved to be a good option for eluting Guaifenesin Dinitrate. In transdermal studies, Guaifenesin Dinitrate seemed to be attracted to canola oil, impairing its link with albumin. The development of a NO prodrug to skeletal muscle is an innovated approach to satellite cell activation and muscle cell growth. Delivering NO to skeletal muscle seeks to promote normal muscle function in injured tissue and possibly to treat neuromuscular disease. Further transdermal studies are needed before the Guaifenesin Dinitrate can penetrate the skin when applied topically.

Keywords: Guaifenesin Dinitrate; myogenesis; satellite cells; nitric oxide.

Lista de Figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1: Fórmula estrutural de metocarbamol, dinitrato de isossorbida (ISDN), guaifenesina e dinitrato de guaifenesina (MyoNovin™)..... | 25 |
|---|-----------|

Lista de Tabelas

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: CLAE - Solvente acetonitrila sem adição de ácido fórmico..... | 33 |
| Tabela 2: CLAE - Solvente acetonitrila com adição de ácido fórmico 0,1%..... | 33 |
| Tabela 3: CLAE - Solvente metanol com adição de ácido fórmico 0,1%..... | 34 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

Camundongos *mdx* – Camundongos com distrofia muscular

CCD – Cromatografia de camada delgada

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CSs – Células satélites

FCF – Fator de crescimento de fibroblasto

FCH – Fator de crescimento de hepatócitos

FCSI – Fator de crescimento semelhante a insulina

FIL – Fator inibidor de leucemia

FRMs – Fatores regulatórios miogênicos

FTC- β – Fator de transformação do crescimento beta

g – Grama

g/mol – Gramas por mol

GDN – Dinitrato de guaifenesina

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

h - Horas

ISDN – Dinitrato de isossorbida

JMN – Junção neuromuscular

MCK – Creatina quinase muscular

MHC – Cadeias pesadas de miosina

mL – Mililitro

μ L – Microlitro

NOS – Óxido nítrico-*sintase*

NO – Óxido nítrico

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial hidrogênico

q.s.p. – Quantidade suficiente para

RMN – Ressonância magnética nuclear

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

Sumário

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Introdução Geral | 1 |
| 2 | Objetivos | 2 |
| 3 | Revisão Bibliográfica | 3 |
| 3.1 | Músculo esquelético | 3 |
| 3.1.1 | Relação músculo e sistema motor, Tecido Muscular, Fibras musculares .. | 3 |
| 3.1.2 | Miogênese | 5 |
| 3.1.3 | Desenvolvimento de células satélites | 7 |
| 3.2 | Óxido nítrico | 9 |
| 3.3 | Dinitrato de Guaifenesina | 12 |
| 4 | Material e Métodos | 16 |
| 4.1 | Síntese do Dinitrato de Guaifenesina | 16 |
| 4.2 | Técnicas para analisar o produto final | 17 |
| 4.2.1 | Cromatografia em coluna | 17 |
| 4.2.2 | Cromatografia em Camada Delgada | 17 |
| 4.2.3 | Cromatografia líquida de alta eficiência | 17 |
| 4.3 | Ensaio transdérmico | 18 |
| 5 | Resultados e Discussão | 20 |
| 5.1 | Cromatografia em Camada Delgada | 20 |
| 5.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência | 20 |
| 5.4 | Ensaio transdérmico | 23 |
| 6 | Conclusões ou Considerações Finais | 24 |
| 7 | Referências | 25 |

1 Introdução Geral

O significado do óxido nítrico (NO) como uma molécula sinalizadora nos mais diversos sistemas biológicos revolucionou as pesquisas a cerca da extensão de sua atividade biológica (ANDERSON, 2000). Pesquisas recentes vêm revelando o envolvimento de NO desde a manutenção inicial da vida – ao controlar a circulação placentária e atuar nas contrações uterinas durante o parto – até o controle endócrino, imunorregulação e neurotransmissão (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2002). Além disso, estudos indicam que a patogênese de doenças cardiovasculares, autoimunidade, rejeição de transplantes, sepse, carcinogênese e genotoxicidade, possam estar associadas ao descontrole na síntese da molécula de NO (NATHAN, 1992; WINK *et al.*, 1998).

Devida a ampla diversidade atribuída nas funções da molécula de NO nos últimos 20 anos vêm aumentando a atenção dos pesquisadores para estudos relacionados a função e sinalização do NO no músculo esquelético (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2002).

Anderson em 2000 demonstrou a participação do NO como mediador da ativação de células satélites e confirmou que a presença de NO no músculo esquelético é capaz de regular as células miogênicas precursoras, desempenha papel importante na sinalização da fusão das células musculares, diferenciação dos mioblastos e crescimento das fibras musculares. Desta maneira, o NO desempenha um papel crucial durante o processo de miogênese, o qual é caracterizado pela formação ou desenvolvimento de fibras do músculo esquelético (TATSUMI *et al.*, 1998; ANDERSON, 2000; TATSUMI *et al.*, 2002).

Com a descoberta da função do NO como mediador da ativação de células satélites para entrar no ciclo celular, o que proporciona novas células precursoras para o crescimento e reparo do músculo esquelético após lesão ou doença; em 2009 Wang, Anderson e Burczynski na University of Manitoba, Winnipeg-MB Canadá sintetizaram, testaram e patentearam o fármaco Dinitrato de Guaifenesina. O objetivo desses pesquisadores foi desenvolver um novo fármaco capaz de proporcionar especificamente NO ao músculo esquelético, e com isso, mantenha a função normal muscular e proporcione o tratamento para doenças neuromusculares (ANDERSON, 2000; WANG *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos por Wang e colaboradores em 2009 em camundongos

demonstram um aumento substancial na síntese de DNA e na expressão de proteínas normais do músculo esquelético – fatores regulatórios miogênicos, Myf-5 e miogenina –, após a administração do fármaco Dinitrato de Guaifenesina via transdérmica e oral (WANG et al., 2009).

Desta forma, as atividades realizadas no ano de 2013 durante o presente trabalho de conclusão de curso envolveram o desenvolvimento e a avaliação da atividade transdérmica do fármaco Dinitrato de Guaifenesina na University of Manitoba, Winnipeg-MB Canadá pelo Programa Ciência sem Fronteiras com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

2 Objetivos

Este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo sintetizar, purificar e caracterizar o fármaco Dinitrato de Guaifenesina e realizar ensaios transdérmicos a partir do método de difusão em célula de *Franz*.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Músculo esquelético

3.1.1 Relação músculo e sistema motor, Tecido Muscular, Fibras musculares

O músculo esquelético é um componente importante do sistema motor, e é altamente eficiente por converter a energia química diretamente em energia mecânica (ENOKA, 1988). Os músculos têm duas fontes nervosas e vasculares que são anatomicamente estudadas, e que são cruciais para o movimento voluntário. A contração muscular é regulada por meio de conexões nervosas em cada fibra muscular e a resposta para o corpo é mediada por nervos e reflexos sensoriais em diferentes níveis do sistema nervoso (RAYMENT et *al.*, 1993). Embora estes processos são claramente importantes para a função, desenvolvimento, crescimento e regeneração muscular, este trabalho de conclusão de curso considerou os processos relacionados aos nervos de forma independente ao crescimento e regeneração do músculo esquelético.

Além do tecido muscular estriado ou esquelético existem outros dois tipos de tecidos musculares no corpo; o tecido muscular liso ou visceral e o tecido muscular cardíaco ou miocárdio. O músculo esquelético, foco dessa pesquisa, é composto de fibras musculares e tecido conjuntivo (tendões, fâscias, tecido adiposo e ligamentos) (BUCKINGHAM et *al.*, 2003).

Todo músculo esquelético é envolvido por uma camada mais espessa de tecido conjuntivo, chamada epimísio, que liga o músculo aos tendões e, em seguida, liga-se aos tendões associados ao osso, cartilagem ou pele. Esta camada protege o músculo, mantendo os feixes de fibra juntos, e ao mesmo tempo, separa os músculos uns dos outros durante a contração e extensão das fibras musculares (GORDON et *al.*, 2000). Dentro do músculo esquelético, existem fascículos ou feixes de fibras musculares, que são envolvidos por uma camada mais fina de tecido conjuntivo, chamada perimísio, que separa os feixes de fibras e permite que os vasos sanguíneos e nervosos cheguem na cavidade muscular. Finalmente, as fibras musculares individuais são cobertas por uma fina camada de tecido conjuntivo, conhecida como endomísio (SQUIRE et *al.*, 2005). Isto permite a contração de cada fibra sem interferência de outras fibras, assim, promovendo a proteção destas fibras e de suas células satélites residentes. Assim como existem alterações na anatomia interna de fibras musculares, a arquitetura dos músculos não é diferente; varia

conforme os diferentes tipos de tecidos musculares no corpo humano (LEFAUCHEUR, 2010).

As células do músculo esquelético são cilíndricas, longas e multinucleadas chamadas fibras musculares, devido a sua forma em rosca quando visualizadas em microscópio óptico (NOGUCHI et *al.*, 2000). Geralmente, as células do músculo esquelético são dificilmente visíveis a olho nu. As fibras musculares são formadas durante o desenvolvimento ou regeneração muscular, a partir da fusão de células imaturas mononucleares ou as células indiferenciadas chamadas mioblastos (FLUCK & HOPPELER, 2003). As membranas plasmática e citoplasmática das células do tecido muscular estriado são chamadas respectivamente de sarcolema e sarcoplasma (BOTTINELLI & REGGIANI, 2000).

Semelhante a outras células, existem organelas no sarcoplasma; assim como a presença de núcleos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e o retículo sarcoplasmático; e de forma única no músculo esquelético, o sarcoplasma também contém túbulos T. Da mesma forma, existem feixes de miofilamentos no sarcoplasma, as chamadas miofibrilas (BOTTINELLI, 2001). Duas proteínas, miosina e actina, são as primeiras miofibrilas que envolvem a contração, e são chamadas de forma respectiva de filamentos grosso e fino (PETTE & STARON, 2001). As miofibrilas estão distribuídas em um padrão de bandas ou "faixas" transversais que se estendem ao longo de fibras musculares, em que o padrão de repetição é chamado de sarcômero.

Os sarcômeros são a unidade básica da contração muscular. Eles estão organizados entre duas linhas-Z que se cruzam aos filamentos de actina nas chamadas linhas-H e banda-I; e entre duas bandas-I existe a presença da banda-A composta por filamentos de miosina (MORGAN & PROSKE, 2004). No sarcômero, os filamentos de actina e miosina cooperaram e/ou interagem com o intuito de produzir a contração de uma fibra muscular. Os filamentos de miosina agarram-se aos filamentos de actina, formando pontes cruzadas. Este processo de deslizamento entre os filamentos encurta o sarcômero entre as linhas-Z durante uma contração concêntrica e alonga o sarcômero durante uma contração excêntrica (POLLARD & BORISY, 2003).

O processo contrátil é regulado pela estrutura dentro da fibra muscular, e por mecanismos de liberação de cálcio. Cada miofibrila está rodeada por retículos

sarcoplasmáticos. Essas vesículas armazenam uma reserva de íons de cálcio, que é usado para produzir contração muscular através da interação com troponina, tropomiosinas e ATPases (CHHABRA & HIGGS, 2007). Dois retículos sarcoplasmáticos cercam o túbulo-T no músculo esquelético, formando uma tríade. Os túbulos T são caracterizados pela invaginação profunda da membrana plasmática, encontrada tanto nas células de músculo esquelético como cardíaco. Há também túbulos T que se projetam a partir do sarcolema para o interior de uma fibra muscular (DEFRANCHI et al., 2005).

O túbulo T é um componente extremamente importante da via de sinalização que transmite uma despolarização do sarcolema, a partir de um potencial de ação do nervo por junção neuromuscular (JNM), para as regiões mais profundas da fibra muscular. Esta despolarização estimula o retículo sarcoplasmático a liberar cálcio; o que aumenta a concentração de íons cálcio dentro do sarcoplasma, e conseqüentemente, à contração da fibra muscular (BOTTINELLI & REGGIANI, 2000).

3.1.2 Miogênese

A formação ou desenvolvimento de fibras do músculo esquelético é denominado miogênese. A miogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário, e também, durante a regeneração de fibras musculares após uma lesão no músculo pós-natal ou adulto (CONBOY & RANDO, 2002). As fases da miogênese são compostas pela formação de mioblastos, proliferação, migração, fusão de fibras, diferenciação, desenvolvimento de células satélites (CSs), inervação e crescimento de fibras. Existem diferentes marcadores moleculares ou celulares para a detecção de células satélites e/ou estado muscular (POWNALL et al., 2002). Assim, esta seção inicia com uma visão geral sobre o desenvolvimento de fibras musculares esqueléticas, até o estabelecimento de células satélites em fibras musculares. Nesse momento, os detalhes da estrutura das células satélite, função das células satélites, ativação e quiescência serão discutidos em detalhes, seguido da apresentação da miogênese durante a regeneração muscular.

Todos os músculos esqueléticos, exceto os músculos da cabeça, são derivados de células precursoras mesodérmicas as quais se originaram da parte dorsal dos somitos. E os somitos iniciam como esferas epiteliais da mesoderme paraxial (KARALAKI et al., 2009). Cada somito se desenvolve com base nos sinais

que são recebidos de seus tecidos circundantes, os quais induzem a expressão de fatores regulatórios miogênicos (FRMs) por células precursoras (DOCKTER, 2000).

Células miogênicas expressando Myf5 e MyoD são referidas como mioblastos (SHI & GARRY, 2006). A grande maioria dos mioblastos no músculo adulto são células miogênicas precursoras, as quais são derivadas de células satélites ativadas. Mioblastos também podem ser derivados a partir de outras fontes além do músculo esquelético; tais como as células-tronco hematopoiéticas, mas estas células não serão detalhadas neste trabalho. Depois de uma lesão muscular, existem sinais que induzem as CSs a se tornarem móveis e se afastarem do seu nicho na fibra muscular. Estes sinais são emitidos a partir da zona danificada do músculo e também a partir de outros locais não danificados ao longo das fibras. Ao receber esses sinais as CSs são ativadas e, em seguida, são capazes de migrar para o local da lesão, e entram no ciclo celular para se tornarem mioblastos (SCHULTZ et al., 1985).

Existem três populações diferentes de mioblastos que foram classificados conforme a ordem em que aparecem no tecido muscular; que incluem embrionária, fetal e adulta/células satélites (EVANS et al., 1999). Mioblastos embrionários são responsáveis pela formação de fibras musculares primárias enquanto mioblastos fetais estão distribuídos ao longo do músculo para formar as fibras secundárias, as quais se desenvolvem ao redor e entre as fibras primárias. Curiosamente, os núcleos que estão contidos no interior das fibras musculares não são capazes de sofrer mitose, uma vez que estas fibras são desenvolvidas a partir da fusão de mioblastos diferenciados com as fibras musculares previamente lesadas. Isso significa que as CSs são as únicas células miogênicas do músculo esquelético que após o nascimento são capazes de sofrer mitose, e portanto, contribuem para o crescimento e regeneração muscular. As células satélites apresentam diferentes origens e destinos, os quais são compreendidos a partir de um estudo detalhado em embriogênese. As CSs podem ser derivadas a partir do somito, bem como a partir de outros tipos de células (COSSU et al., 2000). Além disso, as CSs são determinadas como as células-tronco multipotentes, e portanto, apresentam a capacidade de diferenciar em tecidos não-musculares, tais como osso, tecidos adiposo e conjuntivo (SEALE & RUDNICKI, 2000).

Após uma lesão muscular, células mononucleares, incluindo principalmente as CSs miogênicas são ativadas através de um processo regulado por fatores liberados pelo músculo lesado (MCCLUNG *et al.*, 2007). Com a ativação, as CSs entram no ciclo celular para se tornarem mioblastos e regulam a expressão de dois fatores regulatórios miogênicos (FRMs) primários (Myf5 e MyoD). O fator de crescimento de hepatócitos (FCH) e os macrófagos são relatados por ativar as células miogênicas (LESCAUDRON *et al.*, 1999; TATSUMI & ALLEN, 2004). Fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante a insulina (FCSI), fator de crescimento de fibroblasto (FCF), fator de transformação do crescimento beta (FTC- β) e membros da família interleucina-6, tais como, fator de inibição da leucemia (FIL) e interleucina-6, já foram identificados como grandes facilitadores e reguladores da resposta regenerativa muscular (HAWKE & GARRY, 2001).

Após a fase de proliferação das células miogênicas precursoras ou mioblastos, a expressão de fatores regulatórios miogênicos (FRMs) secundários (miogenina e MRF4) é regulada nas células; o que indica que a diferenciação de mioblastos foi iniciada (CORNELISON & WOLD, 1997). À medida que o programa de diferenciação prossegue mais, a célula começa a expressar proteínas específicas do músculo, tais como as cadeias pesadas de miosina (MHC) e creatina quinase muscular (MCK). A expressão desses genes indica que as células miogênicas precursoras foram diferenciadas em mioblastos (KARALAKI *et al.*, 2009). Os mioblastos se fundem com as fibras musculares lesadas para formar novas fibras musculares e também para reparar as áreas lesadas nessas fibras. Durante a regeneração muscular, moléculas expressas por células e fibras musculares como a m-caderina e m-calpaína, garantem a adesão entre as células durante a fusão dos mioblastos adultos/células satélites com as fibras musculares (KRAUSS *et al.*, 2005).

3.1.3 Desenvolvimento de células satélites

As células satélites (CSs) são células mononucleares que foram primeiramente identificadas como células-tronco musculares em 1961 por Alexander Mauro (MAURO, 1961). As CSs foram nomeadas conforme sua localização, a qual se encontra entre o sarcolema e a lâmina externa das fibras musculares, como observado ao microscópio eletrônico. As CSs são células fusiformes pequenas, que apresentam um núcleo proeminente e baixo volume de organelas. Em tecido

muscular adulto, as CSs apresentam estado de repouso tanto metabolicamente quanto mitoticamente – na fase G0 do ciclo celular (SCHULTZ et *al.*, 1978). As CSs são capazes de manter sua população mesmo a partir de danos e regenerações, durante todo o crescimento até a morte celular. O estado estacionário é conhecido como uma auto-renovação, e estudos acreditam que este estado possa ser regulado através da expressão da miostatina, proteína que tem participação importante no desenvolvimento, proliferação, diferenciação, adesão, migração e apoptose celular e pertence à família de $FTC-\beta$ (MCCROSKERY et *al.*, 2003; AMTHOR et *al.*, 2004; LEITER & ANDERSON, 2010).

Apesar da vasta quantidade de pesquisas sobre marcadores específicos de CSs, ainda não está bem esclarecida a utilização destes marcadores nas três populações diferentes de mioblastos – embrionária, fetal e adulta (CARVAJAL & RIGBY, 2010). Durante a ativação de CSs, estas células expressam diferentes fatores de transcrição, e esta expressão poderá auxiliar na identificação de fases distintas do processo de miogênese; período quiescente, proliferação e diferenciação das CSs. Desta forma, uma maior compreensão sobre a utilização de marcadores de CSs poderá ser auxiliada a partir de pesquisas sobre eventos relacionados às CSs no músculo esquelético.

Os dois fatores de transcrição, Pax3 e Pax7, são os principais controladores da ativação das células satélites (SHI & GARRY, 2006). Especificamente, o fator de transcrição Pax3 é necessário para a migração de células precursoras do músculo e o fator de transcrição Pax7 é considerado necessário para a diferenciação das células satélites. As células satélites musculares aparecem como uma população distinta de células precursoras musculares ao final do desenvolvimento embrionário. No processo chamado recrutamento da linhagem de CSs, os genes Pax3 e Pax7 desempenham um papel importante na diferenciação de células precursoras que irão contribuir para o banco de células satélites (WAGERS & CONBOY, 2005). No entanto, não é claro se esses fatores de transcrição, Pax3 e Pax7, contribuem diretamente para a diferenciação destas células ou se também contribuem para a sobrevivência de células precursoras de CSs (ZAMMIT et *al.*, 2004).

A maioria dos marcadores de superfície celular de CSs identificados até o momento são proteínas relacionadas às propriedades de adesão celular. Os fatores de adesão são necessários já que os processos que ativam as CSs precisam

garantir que estas células possam sair do nicho das fibras musculares, e também, precisam garantir a fusão dos mioblastos com as fibras musculares previamente lesionadas (CORNELISON et al., 2000).

Atualmente, o indicador de transformação da ativação de células satélites mais conhecido é o fator de crescimento de hepatócitos (FCH) com seu receptor c-met logo após a lesão muscular em músculo de camundongos normais (TATSUMI et al., 1998). Em músculo normal e durante a reparação muscular as células satélites expressam c-met e m-caderina (CORNELISON E WOLD, 1997; TATSUMI et al., 1998).

De um modo geral, os marcadores mais utilizados para verificar a reparação muscular são os fatores de transcrição (por exemplo, Pax7), fatores regulatórios miogênicos (membros da família MyoD: MyoD, Myf5, miogenina e MRF4) e marcadores de superfície celular (c-met, Sindecana-3, Sindecana-4, m-caderina, CD34, VCAM-1, integrinas, e miostatina) (WOZNIAK et al., 2003; FIGEAC et al., 2007).

3.2 Óxido nítrico

O significado do óxido nítrico (NO) como uma molécula sinalizadora nos mais diversos sistemas biológicos revolucionou as pesquisas a cerca da extensão de sua atividade biológica (ANDERSON, 2000). A partir da década de 80, uma ampla diversidade de pesquisas envolvendo a fisiologia humana e animal com a molécula de NO tem sido desenvolvida (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2002).

A molécula de NO pode ser gerada por uma família de isoenzimas que são expressas em grande diversidade em células de mamíferos, por meio da catálise enzimática do aminoácido essencial, L-arginina. Essa catálise é conduzida pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS), e envolve o aminoácido L-arginina na presença da molécula oxigênio, e tem como resultado a formação de L-citrulina e o radical livre gasoso, NO. O óxido nítrico também pode ser produzido pelas células musculares lisas, podendo regular a atividade dessas células por um mecanismo dependente da monofosfato cíclico de guanosina – GMPc (MONCADA et al., 1991).

O óxido nítrico está envolvido desde a manutenção inicial da vida – ao controlar a circulação placentária e atuar nas contrações uterinas durante o parto – até o controle endócrino, imunorregulação e neurotransmissão. No sistema nervoso

periférico (SNP) o NO atua como neurotransmissor; e no sistema nervoso central (SNC), como neuromodulador para o controle da atividade normal - formação de memória e intensidade da resposta a um estímulo doloroso (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2002).

A molécula de NO atua na manutenção do fluxo sanguíneo, sendo um importante mediador da ereção peniana. Os efeitos do NO de origem vascular estão relacionados à inibição plaquetária e à contração do músculo liso. A ação do NO no sistema endócrino parece mediar a liberação de insulina e acredita-se que o NO esteja associado à patogênese do diabetes *mellitus* (NATHAN, 1992; CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997).

Estudos indicam que a patogênese de doenças cardiovasculares, autoimunidade, rejeição de transplantes, sepse e genotoxicidade, possam estar associadas ao descontrole na síntese da molécula de NO (NATHAN, 1992). Injúria neuronal e doenças cerebrais degenerativas, como doença de Parkinson e Alzheimer, também podem estar associadas à síntese aumentada de NO (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997).

Além disso, foi reportado que em células incapazes de produzir NO associadas a outros fatores, poderia ocorrer o surgimento de tumores; portanto o NO também apresenta papel como agente de iniciação da carcinogênese (WINK et al., 1998). Reduzidas concentrações de NO produzidas pelas células tumorais podem estar associadas ao desenvolvimento do tumor, sua vascularização e seu potencial invasivo (JENKINS et al., 1995). Estudos indicam que o NO pode afetar a expressão e a atividade de proteínas essenciais no ciclo celular e, com isso, pode ser alvo das mutações do DNA celular (WINK et al., 1998).

A indução da síntese de NO aparentemente está associada às defesas do organismo contra infecções, inflamações e muitas neoplasias, porém quando produzida em altas concentrações, pode causar danos teciduais e consequente morte celular (MONCADA et al., 1991). No sistema imune e na inflamação, a molécula de NO endógeno demonstraram papéis pró e anti-inflamatórios. Além disso, estudos indicam efeitos protetores do NO na destruição de muitos patógenos e de células tumorais (NATHAN, 1992).

Em 2000 Anderson na University of Manitoba, Winnipeg-MB Canadá apresentou o NO como mediador da ativação das células satélites, incluindo

hipertrofia morfológica e diminuição da adesão no complexo laminar das fibras musculares. Apesar da ativação e recrutamento das células satélites para o ciclo celular permitir o reparo e adaptação muscular, o sinal de ativação do reparo muscular ainda não é conhecido. Entretanto, pesquisadores comprovaram que a redução da produção do NO prejudica a regeneração muscular em camundongos com músculos normais e agrava o quadro clínico em camundongos com distrofia muscular – *mdx* (ANDERSON et al., 1995; ANDERSON 1998; ANDERSON, 2000).

Anderson em 2000 demonstrou que NO é capaz de mediar a ativação de células satélites a entrarem no ciclo celular. De acordo com três testes independentes, foi demonstrado que o NO é fundamental para o rápido sinal de transdução em uma lesão na ativação as células satélites *in vivo*. A partir de técnicas de cultivo celular e histologia foi demonstrado que a inibição farmacológica do óxido nítrico-sintase (NOS) impede a ativação imediata das células miogênicas que são induzidas pós lesão muscular, e por impedir tal ativação, atrasa a hipertrofia das células satélites no músculo esquelético (ANDERSON, 2000; ANDERSON & VARGAS, 2003; WOZNIAK & ANDERSON, 2007).

A inibição de NOS em camundongos normais e *mdx* durante uma lesão provocou alterações no reparo ao longo das fibras musculares lesadas. Essa inibição de NOS retarda e restringe a ativação de células satélites induzidas pós lesão muscular, a partir de mudanças na adesão, rendimento celular, morfologia e expressão de dois marcadores de células satélites, c-met e m-caderina (ANDERSON 1998; ANDERSON et al., 1998; ANDERSON, 2000). Um modelo propõe a hipótese de que a liberação de NO medeia a ativação de células satélites, e que existe uma relação entre o aumento da atividade de NOS com a produção de NO (ANDERSON, 2000; WOZNIAK & ANDERSON, 2005; WOZNIAK & ANDERSON, 2009).

Como as células satélites estão localizadas entre o sarcolema e a lâmina externa das fibras musculares, elas estão idealmente posicionadas para promover o "primeiro-socorro" a uma liberação induzida de NO a partir de NOS. Nos experimentos realizados por Anderson em 2000, camundongos pré-tratados foram usados para inibir ou diminuir a atividade de NOS e o músculo tibial anterior (TA) desses animais foram submetidos a uma lesão por esmagamento. Cultivo celular da lesão do músculo TA foi determinado após 30 minutos imediatamente após a lesão,

e o reparo muscular foi avaliado a longo prazo (ANDERSON, 2000; ANDERSON 2006).

O músculo de camundongos *mdx* apresentou carência de NOS e camundongos *knockout* apresentou perda total da expressão NOS, o que causou maiores implicações no reparo muscular (MCINTOSH & ANDERSON, 1995; PERNITSKY & ANDERSON, 1996). Os efeitos da baixa ou ausência da expressão de NOS em cultivo celular de camundongos *mdx* e *knockout* foram examinados durante esses experimentos. A rápida ativação das células satélites após a lesão, mostrada pelo aumento da liberação de células miogênicas e por alterações morfológicas, foi prejudicada pela inibição de NOS. Assim a inibição de NOS foi demonstrada por afetar negativamente o reparo muscular (ANDERSON, 2000).

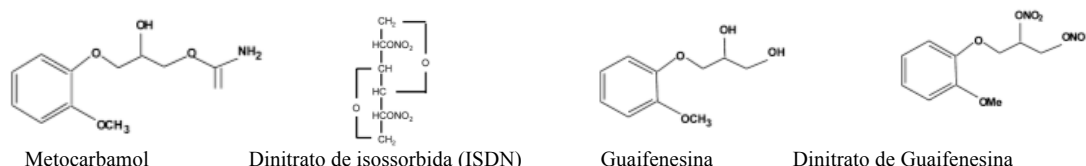
Desta forma, Anderson em 2000 demonstrou a participação do NO como mediador da ativação de células satélites em cultura celular via liberação FCH, e confirmaram que a liberação de NO se dá a partir do alongamento muscular, regula as células satélites quiescentes e desempenha papel importante na sinalização da fusão, diferenciação dos mioblastos e crescimento muscular; portanto, desempenha um papel crucial durante o processo de miogênese (TATSUMI et al., 1998; ANDERSON, 2000; TATSUMI et al., 2001; TATSUMI et al., 2006).

3.3 Dinitrato de Guaifenesina

Com a descoberta da função do NO como mediador da ativação de células satélites para entrar no ciclo celular, o que proporciona novas células precursoras para o crescimento do músculo esquelético e reparo muscular após lesão ou doença. Em 2009, Wang, Anderson e Burczynski na University of Manitoba, Winnipeg-MB Canadá sintetizaram, testaram e patentearam o fármaco Dinitrato de Guaifenesina com nome comercial, MyoNovin™. O objetivo desses pesquisadores foi desenvolver um novo medicamento que proporcione especificamente NO ao músculo esquelético, e com isso, mantenha a função normal muscular e proporcione o tratamento para doenças neuromusculares (ANDERSON, 2000; WANG et al., 2009).

Nos experimentos realizados por Wang e colaboradores em 2009, uma nova formulação doadora de NO foi utilizada. Na síntese dessa nova molécula doadora de NO, dinitrato de guaifenesina – GDN, teve a guaifenesina selecionada como molécula base. A guaifenesina é um metabólito ativo do metocarbamol, e acredita-se

que estas moléculas apresentem a mesma função farmacológica. O metocarbamol, análogo da guaifenesina, é um carbamato ou uretano o que significa que essa molécula faz parte de um grupo de compostos orgânicos que compartilham do mesmo grupo funcional com estrutura $-NH(CO)O-$ (Figura 1). Além disso, o metocarbamol é geralmente administrado como relaxante muscular para o



tratamento sintomático de distúrbios musculoesqueléticos (POULI et al., 1994).

Figura 1: Fórmula estrutural de metocarbamol, dinitrato de isossorbida (ISDN), guaifenesina e dinitrato de guaifenesina (MyoNovin™). Representação das fórmulas estruturais dos componentes estudados e utilizados para a síntese do fármaco Dinitrato de Guaifenesina. Fonte: Imagem adaptada de Wang et al., 2009.

Nesse estudo, Wang e colaboradores em 2009 demonstraram que metocarbamol aumenta a síntese de DNA em músculo esquelético *in vivo*, e também apresentou boa adaptação aos efeitos significativos de NO (liberados pelo doador de NO, dinitrato de isossorbida – ISDN) no músculo esquelético dos camundongos (Figura 1). Até o presente estudo, não está claro se o mecanismo de ação do metocarbamol está relacionado aos efeitos vasculares durante a administração lenta e contínua do fármaco (perfusão) ou com a ação direta sobre os nervos axonais, motor e sensorial, quando expostos ao metocarbamol (POULI et al., 1994).

Nos experimentos realizados por Wang e colaboradores em 2009, grupos de camundongos foram submetidos a quatro tratamentos farmacológicos diferentes, entre eles, metocarbamol 1%; dinitrato de isossorbida (ISDN) 0,2%; dinitrato de guaifenesina 2%; e metocarbamol 1% + dinitrato de isossorbida (ISDN) 0,2%.

Os camundongos submetidos aos tratamentos via transdérmica com metocarbamol 1%; ISDN 0,2%; metocarbamol 1% + ISDN 0,2% apresentaram aumento na ativação de células satélites e proliferação celular pelo aumento da síntese de DNA. Metocarbamol 1% promoveu um aumento na síntese de DNA em 26-28% no músculo traseiro e quadríceps em relação ao controle. ISDN 0,2% apresentou efeitos similares, induzindo um aumento na síntese de DNA em 19%-

24% no músculo traseiro e quadríceps em relação ao controle. O tratamento realizado na combinação de metocarbamol 1% com ISDN 0,2% produziu um aumento significativo na síntese de DNA em 35-38% no músculo traseiro e quadríceps após 24 horas de exposição *in vivo* (WANG et al., 2009).

A administração transdérmica de GDN 2% promoveu aumento na síntese de DNA em 37-39% no músculo traseiro e quadríceps de camundongos após 24 horas de exposição *in vivo*. A administração oral de GDN 2% induziu um aumento das células satélites em 40% em músculo traseiro e 55% do quadríceps em camundongos após 24 horas da administração (WANG et al., 2009). Assim, os resultados obtidos por Wang e colaboradores em 2009 demonstram um aumento substancial na síntese de DNA e na expressão de proteínas normais do músculo esquelético – fatores regulatórios miogênicos, Myf-5 e miogenina –, após a administração de GDN via transdérmica e oral (WANG et al., 2009).

Myf-5 e MyoD são fatores regulatórios miogênicos primários, membros da família MyoD, que desempenham um papel importante no desenvolvimento muscular. Quando as células satélites são ativadas, e por conseguinte, proliferam, a expressão de Myf-5 e MyoD é aumentada. A diminuição da expressão dos fatores de transcrição, Pax3 e Pax7, e o aumento da expressão dos fatores regulatórios secundários, miogenina e MRF-4, caracteriza o processo de diferenciação miogênica, aonde as células satélites se proliferam e são denominadas mioblastos. Os mioblastos diferenciados se fundem às fibras musculares previamente lesadas, desencadeando a reparação muscular (SHI & GARRY, 2006). Wang e colaboradores em 2009 sugeriram que a nova formulação doadora de NO, GDN, tem como função ativar as células satélites e então promover a miogênese.

Uma vez que a ativação e proliferação das células satélites do músculo esquelético normalmente demonstram um declínio em animais adultos mais velhos, o aumento considerável na ativação e miogênese em músculos de camundongos adultos de 5 meses após 24h de administração com GDN a partir desse estudo, indicou que essa nova formulação é um tratamento promissor com potencial de estimular a proliferação celular. Além disso, a complexidade dos efeitos de NO resulta na melhoria da saúde muscular em camundongos mdx com distrofia muscular. Assim, esses experimentos sugerem que a nova molécula doadora de NO possa ser benéfica para músculo normal e distrófico (WANG et al., 2009).

No entanto, parece provável que a molécula GDN possa desempenhar múltiplas funções farmacológicas, assim como participar na regeneração muscular esquelética, controle da dor, relaxamento muscular, e fornecimento de NO (WANG *et al.*, 2009).

A administração transdérmica de fármacos parece ser preferível quando comparada com a administração via oral ou outras vias de administração. Isso pode ser explicado pela facilidade com que o fármaco via transdérmica poderá ser removido, ampla disponibilidade de aplicação da droga e capacidade de regulação dos níveis de dosagem na pele. Além disso a entrega da droga pela via de administração transdérmica pode ser uma boa opção para pessoas idosas (WANG *et al.*, 2009).

4 Material e Métodos

4.1 Síntese do Dinitrato de Guaifenesina

A síntese de Dinitrato de Guaifenesina foi realizada em duas etapas, segundo protocolos realizados anteriormente por Wang, Anderson e Burczynski na mesma Instituição, University of Manitoba, Winnipeg-MB Canadá (WANG *et al.*, 2009).

A primeira reação consistiu na adição de 20 g de guaiacol ($C_7H_8O_2$), com brometo de alila (C_3H_5Br) e carbonato de potássio (K_2CO_3). A equivalência desses reagentes foi de 1,0 para o guaicol, 1,2 brometo de alila e 1,5 carbonato de potássio.

O produto intermediário desta reação foi extraído com acetona, para separar as fases aquosa e orgânica. Depois dessa extração a fase orgânica foi concentrada por destilador à vácuo para eliminar os resíduos finais da acetona e o produto intermediário apresentou características de composto oleoso. O produto intermediário foi agitado com acetato de etila, formando uma mistura homogênea, e posteriormente, foi adicionado sulfato de sódio anidro (agente secante), com o objetivo retirar qualquer resíduo aquoso na fração orgânica.

Na segunda reação, ao produto intermediário foram adicionados iodo (I_2) e nitrato de prata ($AgNO_3$). A equivalência desses reagentes foi de 1,0 para o produto intermediário, 1,0 iodo e 4,0 nitrato de prata. Esses reagentes foram adicionados com 100 mL de acetonitrila a um balão de fundo chato 500 mL, retido em uma chapa aquecedora a temperatura de $0^\circ C$. Após 5 minutos a temperatura aumentada para $90^\circ C$.

Da mesma forma, o produto final foi extraído com acetona, concentrado com destilador à vácuo, agitado com acetato de etila, e dissolvido em sulfato de sódio anidro. Todas as etapas foram realizadas com o objetivo de obter um produto mais purificado, livre de resíduos aquosos. Após essas etapas, o frasco foi deixado a temperatura ambiente no laboratório durante 12 h para evaporar qualquer presença de água, cetona e/ou éster ainda presentes na composição.

Uma pequena amostragem foi coletada em tubos de vidros para realizar a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a qual determina propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas contidos no produto intermediário (MORRIS, 2014).

4.2 Técnicas para analisar o produto final

Com o objetivo de monitorar a reação química, separar e identificar o produto final, Dinitrato de Guaifenesina, foi utilizado técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna com adsorvente sílica gel, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e (RMN).

4.2.1 Cromatografia em coluna

A técnica de cromatografia em coluna consiste em um coluna de vidro, nesse caso, aberta em ambas as extremidades, semelhante a uma bureta, preenchida com um adsorvente adequado (ATTALLAH, 2011). O adsorvente utilizado foi 500 g de sílica gel suspenso com solvente hexano e acetato de etila na equivalência 9:1, respectivamente. O produto final foi adicionado na extremidade superior da coluna de vidro, após adição do adsorvente e solvente. O produto final, como dito anteriormente, apresentou consistência oleosa e cor característica ao óleo, desta forma, foi possível visualizar as diferentes zonas colorimétricas na coluna de vidro transparente, que foram recolhidas em tubos *ependorf* e enumeradas conforme a ordem de coleta pela parte inferior do ensaio transdérmico, de 1 a 25.

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada

A técnica de CCD consiste na separação de componentes de uma mistura sólido-líquido, aonde a fase móvel (solvente líquido) migra sobre uma membrana absorvente retida em superfície plana – lâmina de vidro (FLINN, 1989).

Com a finalidade de testar a pureza e avaliar todos os componentes da mistura, a técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) foi utilizada durante toda a síntese do fármaco Dinitrato de Guaifenesina com um sistema de solvente incluindo 90% de hexano e 10% de acetato de etila (equivalência 9:1).

Além disso, a técnica de CCD foi utilizada para monitorar a separação entre o produto final, adsorvente e solvente na cromatografia em coluna, e checar a eficiência da separação através da identificação das frações coletadas.

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem como componentes essenciais a fase móvel (solvente), coluna e detector. A técnica de CLAE foi realizada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra após a síntese do produto final.

A fase móvel da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) deve ser um solvente que dissolva a amostra, mas que não apresente interação pela amostra; deverá ser compatível com o detector empregado; deve possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra; o solvente deve apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que seja possível realizar análises de alta sensibilidade, pois as impurezas poderão interferir na detecção do analito por ultravioleta (LIU, 2012).

Três solventes diferentes foram testados em diversas concentrações, injeções e fluxos totais pela técnica CLAE: acetonitrila; acetonitrila + ácido fórmico 1%; metanol + ácido fórmico 1%. O objetivo foi definir a melhor fase móvel para separar, identificar e quantificar os componentes do produto final.

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões aplicadas. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material em seu interior (LIU, 2012). No experimento em questão, a coluna utilizada foi a octadecil, C18 – 4,6x1,5 mm, partícula de 3 µm.

Nesse experimento o detector utilizado foi de acordo com o tipo de resposta; detector sensíveis ao fluxo de massa. A resposta é proporcional à quantidade da massa do produto final que chega ao detector por unidade de tempo (LIU, 2012). Desta forma, durante a realização desse experimento, o CLAE estava acoplado ao detector, espectrômetro de massa (CLAE-EM/EM).

4.3 Ensaio transdérmico

Após a confirmação do produto final pelas técnicas de CLAE e RMN, foram realizados testes de liberação transdérmica do fármaco Dinitrato de Guaifenesina a partir do método de difusão em célula de *Franz*. Célula de difusão de *Franz* é um método que analisa a interação entre a pele, drogas e formulações utilizando membranas naturais ou sintetizadas. O sistema de liberação transdérmica é constituído por dois componentes de vidro separados por uma fina membrana. O compartimento doador, contém o fármaco, o qual é colocado na parte acima da membrana e o compartimento receptor contém uma solução aonde o fármaco é solúvel. A passagem do fármaco pela membrana para o compartimento receptor é monitorada pela análise de amostras pela técnica de CLAE (NG et al., 2010). No presente trabalho dois sistemas foram utilizados e as membranas sintéticas foram usadas para testar a permeabilidade de Dinitrato de Guaifenesina.

Para essa avaliação, duas soluções foram utilizadas, uma continha tampão fosfato-salino (PBS - 0,8 g de NaCl, 0,02 g de KCl, 0,17 g de Na₂HPO₄ e 0,02 g de KH₂PO₄ em água MilliQ q.s.p 100 mL e pH 7.4) com 1% de albumina (PBS + ALB1%), e outra, sem a proteína albumina (apenas PBS).

Cada sistema receptor do ensaio transdérmico foi preenchido com um tipo de solução específica na parte inferior, aonde o sistema 1 continha PBS + ALB1% e o sistema 2 apenas PBS. Na parte superior, foi adicionado sob a membrana 1 mL do Dinitrato de Guaifenesina dissolvido em 12,3 mL de óleo de canola. Após uma hora as amostras foram coletadas dos dois sistemas em tubos *ependorf*, com o auxílio de uma seringa e os tubos foram enumerados de acordo com a ordem em que as amostras foram extraídas de cada sistema.

As amostras restantes de cada sistema foram coletadas, após 2, 4, 12 e 24 h da mesma maneira foram adicionadas em tubos *ependorf* com o auxílio de uma seringa e os tubos foram enumerados de acordo com a ordem em que as amostras foram extraídas de cada sistema. Ambos os sistemas permaneceram em uma placa magnética durante todo o experimento.

Para a análise de CLAE, as amostras resultantes de cada sistema coletadas e enumeradas (500 mL/tubo *ependorf*) foram transferidas para tubos de vidro e em cada tubo de vidro foi adicionado 500 mL de acetonitrila.

5 Resultados e Discussão

5.1 Cromatografia em Camada Delgada

A realização da técnica de CCD teve como objetivo monitorar a primeira reação de síntese, e com isso, confirmar a identidade deste produto intermediário com o produto anteriormente catalogado pela mesma Instituição. O produto intermediário foi pesado, e obteve-se 25,16 g. Comparando com o resultado catalogado anteriormente, foi perdido cerca de 1,2 g durante a reação.

A técnica de CCD foi novamente realizada para monitorar a segunda reação de síntese, e desta vez apresentou como resultado uma reação não completa; isto quer dizer, que o produto final não estava 100% purificado, e portanto, na fase orgânica ainda existia porção aquosa. O produto intermediário foi pesado, e obteve-se 6,65 g.

5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de CLAE foi realizada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra após a síntese do produto final, e conseqüentemente, determinar o tempo de eluição do fármaco Dinitrato de Guaifenesina e detectar outros picos em relação a massa molecular de outras substâncias (como dito anteriormente o produto final não estava 100% purificado).

Foi demonstrado pelas técnicas de CCD e CLAE que das 25 amostras coletadas pela técnica de cromatografia em coluna com adsorvente sílica gel, 7 amostras (5-11) apresentavam Dinitrato de Guaifenesina em sua composição.

Após a confirmação da massa molecular de Dinitrato de Guaifenesina presente nas amostras de 5 a 11, essas amostras foram adicionadas em um mesmo balão de fundo chato de vidro, o qual foi deixado a temperatura ambiente na bancada do laboratório durante 12 horas, para evaporar qualquer presença de água, cetona e/ou éster ainda presentes na composição.

Posteriormente, o produto final (amostras de 5 a 11) foi analisado por três solventes em diferentes concentrações, injeções e fluxos totais pela técnica CLAE: acetonitrila; acetonitrila + ácido fórmico 0,1%; metanol + ácido fórmico 0,1%. O objetivo foi definir a melhor fase móvel para separar, identificar e quantificar os componentes do produto final.

Desta maneira, o fármaco Dinitrato de Guaifenesina foi analisado em diferentes concentrações de acetonitrila e sem ácido fórmico (tabela 1). O solvente

acetonitrila 60% e 80% dissolvidos em água e o solvente acetonitrila 100%, todos sem adição de ácido fórmico, foram testados.

Tabela 1: CLAE - Acetonitrila sem adição de ácido fórmico. Demonstração dos tempos de eluição do fármaco Dinitrato de Guaifenesina pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aonde foi analisado o solvente acetonitrila (ACN) sem adição de ácido fórmico em diferentes concentrações, injeções e fluxos totais.

ACN – Concentração: 1 mg/mL de Dinitrato de Guaifenesina. Injeção: 1 µL. Sem ácido fórmico

| Fluxo | ACN 60% | ACN 80% | ACN 100% |
|------------|-------------|-----------|-------------|
| 0,7 mL/min | 4,5 minutos | | |
| 0,8 mL/min | 8,5 minutos | 4 minutos | 2,5 minutos |
| 0,9 mL/min | | | 2,5 minutos |
| 1,0 mL/min | 3 minutos | | |
| 1,2 mL/min | 3 minutos | | 2 minutos |

Da mesma maneira, o fármaco Dinitrato de Guaifenesina foi analisado por CLAE em diferentes concentrações de acetonitrila com ácido fórmico (tabela 1). O solvente acetonitrila 60% e 80% + ácido fórmico 0,1% dissolvidos em água e solvente acetonitrila 100% + ácido fórmico 0,1% foram testados.

Tabela 2: CLAE – Acetonitrila com adição de ácido fórmico 0,1%. Demonstração dos tempos de eluição do fármaco Dinitrato de Guaifenesina pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aonde foi analisado o solvente acetonitrila (ACN) com adição de ácido fórmico 0,1% em diversas concentrações, injeções e fluxos totais.

ACN – Concentração: 1 mg/mL de Dinitrato de Guaifenesina. Injeção: 10 µL. 0,1% ácido fórmico

| Fluxo | ACN 60% | ACN 80% | ACN 100% |
|------------|-----------|-------------|-------------|
| 0,7 mL/min | | | 3 minutos |
| 0,8 mL/min | 5 minutos | 3 minutos | 2,5 minutos |
| 1,0 mL/min | | 2,5 minutos | 2 minutos |

Num terceiro momento, o fármaco Dinitrato de Guaifenesina foi analisado por CLAE em diferentes concentrações de metanol com ácido fórmico (tabela 3). Solvente metanol 60% e 80% + ácido fórmico 0.1% dissolvidos em água e solvente metanol 100% + ácido fórmico 0.1% foram testados.

Tabela 3: CLAE - Metanol com adição de ácido fórmico 0,1%. Demonstração dos tempos de eluição do fármaco Dinitrato de Guaifenesina pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aonde foi analisado o solvente metanol (MET) com adição de ácido fórmico 0,1% em diversas concentrações, injeções e fluxos totais.

MET – Concentração: 1 mg/mL de Dinitrato de Guaifenesina. Injeção: 10 µL.
0,1% ácido fórmico

| Fluxo | MET 60% | MET 80% | MET 100% |
|------------|-------------|-----------|-------------|
| 0,8 mL/min | 8,5 minutos | 3 minutos | 2,5 minutos |
| 1,0 mL/min | 6,5 minutos | 3 minutos | |
| 1,2 mL/min | 5,5 minutos | 2 minutos | |
| 1,4 mL/min | 4,5 minutos | 2 minutos | |

Comparando o fluxo total entre metanol e acetonitrila, o solvente acetonitrila desempenhou os melhores resultados, uma vez que o tempo de eluição de Dinitrato de Guaifenesina foi menor para o solvente acetonitrila. O solvente acetonitrila também desempenhou bons resultados quando comparado com os trabalhos realizados por Wang e colaboradores em 2009. Além disso, foi possível observar que quanto maior a concentração do solvente (menos diluído em água) menor será o tempo de eluição, de modo que o pico de Dinitrato de Guaifenesina é observado mais rapidamente.

Portanto, a pureza e a caracterização de Dinitrato de Guaifenesina foram confirmadas a partir da técnica de CLAE e o solvente acetonitrila 60% (sem adição de ácido fórmico) demonstrou ser uma boa opção para a fase móvel para analisar o fármaco Dinitrato de Guaifenesina.

A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é capaz de determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas contidos no produto final (MORRIS, 2014). A técnica de RMN juntamente com a

CLAE identificaram e confirmaram a massa molecular de Dinitrato de Guaifenesina, 288,06 g/mol (Wang et al., 2009).

Este estudo inicial abre uma nova categoria de moléculas que combinam doadores de ON e relaxantes musculares. Este novo relaxante muscular, Dinitrato de Guaifenesina, aumenta o efeito de NO na ativação e proliferação de células satélites para o crescimento e regeneração muscular.

5.4 Ensaios transdérmicos

Além de caracterizar o fármaco Dinitrato de Guaifenesina, a técnica de CLAE, foi utilizada para monitorar as amostras coletadas durante o ensaio transdérmico.

Considerando Dinitrato de Guaifenesina como um fármaco lipofílico, era esperado uma ligação entre o fármaco Dinitrato de Guaifenesina e a proteína albumina no sistema (PBS + ALB 1%) durante o ensaio transdérmico. No entanto, analisando todas as amostras do sistema PBS + ALB 1% pela técnica de CLAE, os resultados desse sistema foram semelhantes ao sistema contendo apenas PBS. Isso significa que o fármaco não foi permeável a membrana (mimetizando a fisiologia da pele humana) durante o ensaio transdérmico.

Após caracterizar o fármaco pela técnica de CLAE, foi observado que o tempo de eluição de Dinitrato de Guaifenesina estava entre 9-11 minutos quando em fase móvel com acetonitrila 60% dissolvido em água. E com isso, era esperado observar o mesmo tempo de eluição nos resultados de ensaios transdérmicos obtidos pela técnica de CLAE. Porém, não foi observado pico de Dinitrato de Guaifenesina nesse sistema, identificando a não interação entre o fármaco-proteína em questão.

Wang e colaboradores em 2009 demonstraram que o óleo de soja foi favorável para estudar a permeabilidade em ensaio transdérmico. Durante a realização deste trabalho o óleo de canola foi analisado e não apresentou resultados satisfatórios. Uma hipótese para explicar a falha entre a ligação do fármaco Dinitrato de Guaifenesina com a proteína albumina, pode ser pela afinidade de Dinitrato de Guaifenesina com o óleo de canola. A forte interação entre Dinitrato de Guaifenesina e seu veículo pode ter sido tão específica que pode ter prejudicado a ligação fármaco-proteína. Desta maneira, faz-se necessário estudos futuros para encontrar um veículo que apresente menos afinidade com Dinitrato de Guaifenesina em ensaios transdérmicos.

6 Conclusões ou Considerações Finais

- A metodologia utilizada foi eficiente para produzir e caracterizar o fármaco Dinitrato de Guaifenesina;
- Foi determinada uma pureza de mais de 95% após utilizar as técnicas de CLAE e RMN;
- O solvente acetonitrila 60% em água demonstrou ser uma opção de fase móvel para analisar o fármaco Dinitrato de Guaifenesina;
- O uso de óleo de canola como veículo para Dinitrato de Guaifenesina não foi favorável para estudar a permeabilidade em ensaio transdérmico. Uma alternativa para estudos futuros é testar outro veículo que apresente menos afinidade com Dinitrato de Guaifenesina em ensaio transdérmico.
- Esta descoberta tem implicações importantes sobre o potencial para atenuar o impacto das interações neuromusculares no crescimento muscular, envelhecimento e reabilitação provinda de trauma. Mais estudos transdérmicos são necessários antes da validação do uso tópico de Dinitrato de Guaifenesina.

7 Referências

- AMTHOR, H.; NICHOLAS, G.; MCKINNELL, I.; KEMP, C. F.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; PATEL, K. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Developmental Biology**, v. 270, n. 1, p. 19-30, 2004.
- ANDERSON, J. E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. **J. Exp. Biol.**, v. 209, p. 2276-92, 2006.
- ANDERSON, J.E. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, p. 1859-74, 2000.
- ANDERSON, J.E. Studies of the dynamics of skeletal muscle regeneration: the mouse came back! **Biochem. Cell Biol.** v. 76, p. 13-26, 1998.
- ANDERSON, J.E., GARRETT, K., MOOR, A., MCINTOSH, L., AND PENNER, K. Dystrophy and myogenesis in the *mdx* diaphragm. **Muscle Nerve**, v. 21, p. 1153-65, 1998.
- ANDERSON, J.E.; MITCHELL, C.M.; MCGEACHIE, J.K.; GROUNDS, M.D. The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice. **Exp. Cell Res.** v. 216, p. 325-34, 1995.
- ANDERSON, J.E.; VARGAS, C. Correlated NOS-1 α and myf5 expression by satellite cells in mdx mouse muscle regeneration during NOS manipulation and deflazacort treatment. **Neuromuscul. Disord**, v. 13, p. 388-96, 2003.
- ATTALLAH, M.F; BORAI, E.H; HILAL, M.A.; SHEHATA, F.A; ABO-ALY, M.M. Utilization of different crown ethers impregnated polymeric resin for treatment of low level liquid radioactive waste by column chromatography. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p. 73-81, 2001.
- BOTTINELLI, R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: Do myosin isoforms tell the whole story? **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 443, n. 1, p. 6-17, 2001.
- BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. An skeletal muscle fibres: Molecular and functional diversity. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 73, n. 2-4, p. 195-262, 2000.
- BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUËL, J.; MEILHAC, S.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: From somite to limb. **Journal of Anatomy**, v. 202, n. 1, p.59-68, 2003.
- CARVAJAL J. J.; RIGBY P. W. J. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle. **Exp. Cell Res**, v. 316, p. 3014–18, 2010.
- CHHABRA, E. S.; HIGGS, H. N. The many faces of actin: Matching assembly factors with cellular structures. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1110-21, 2007.

CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDET, D. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 100, n.10, p.2424-29, 1997.

CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. The regulation of notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. **Developmental Cell**, v. 3, n. 3, p. 397-409, 2002.

CORNELISON, D. D. W.; OLWIN, B. B.; RUDNICKI, M. A.; WOLD, B. J. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. **Developmental Biology**, v. 224, n.2, p. 122-37, 2000.

CORNELISON, D. D., & WOLD, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. **Developmental Biology**, v. 191(2), p. 270-83, 1997.

COSSU, G.; DE ANGELIS, L.; BORELLO, U.; BERARDUCCI, B.; BUFFA, V.; SONNINO, C.; MOLINARO, M. Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 44, n. 6, p. 699-706, 2000.

DEFRANCHI, E.; BONACCURSO, E.; TEDESCO, M.; CANATO, M.; PAVAN, E.; RAITERI, R.; REGGIANI, C. Imaging and elasticity measurements of the sarcolemma of fully differentiated skeletal muscle fibres. **Microscopy Research and Technique**, v. 67, n. 1, p. 27-35, 2005.

DOCKTER, J. L. Sclerotome induction and differentiation. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 48, n. 48, p. 77-127, 2000.

ENOKA, R. M. Muscle strength and its development - new perspectives. **Sports Medicine**, v. 6, n. 3, p. 146-68, 1988.

EVANS, D. J. R.; BRITLAND, S.; WIGMORE, P. M. Differential response of fetal and neonatal myoblasts to topographical guidance cues in vitro. **Development Genes and Evolution**, v. 209, n. 7, p. 438-42, 1999.

FIGEAC, N.; DACZEWSKA, M.; MARCELLE, C.; JAGLA, K. Muscle stem cells and model systems for their investigation. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 12, p. 3332-42, 2007.

FLINN, P.E; JUHL, Y.H; LAYLOFF, T.P. A simple, inexpensive thin-layer chromatography method for the analysis of theophylline tablets. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, n. 5, p. 555-59, 1989.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: O simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, 2000.

FLUCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 146, n. 146, p. 159-216, 2003.

- GORDON, A. M., HOMSHER, E., & REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 853-924, 2000.
- HAWKE TJ, GARRY DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 534-51, 2001.
- JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, I.I. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.92, p.4392-96, 1995.
- KARALAKI, M.; FILI, S.; PHILIPPOU, A.; KOUTSILIERIS, M. Muscle regeneration: Cellular and molecular events. **In Vivo**, v. 23, n. 5, p. 779-96, 2009.
- KRAUSS, R. S.; COLE, F.; GAIO, U.; TAKAESU, G.; ZHANG, W.; KANG, J. S. Close encounters: Regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 11, p. 2355-62, 2005.
- LEFAUCHEUR, L. A second look into fibre typing - relation to meat quality. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 257-70, 2010.
- LEITER, J. R. S.; ANDERSON, J. E. Satellite cells are increasingly refractory to activation by nitric oxide and stretch in aged mouse-muscle cultures. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 132-36, 2010.
- LESCAUDRON, L.; PELTEKIAN, E.; FONTAINE-PERUS, J.; PAULIN, D.; ZAMPIERI, M.; GARCIA, L.; PARRISH, E. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, n. 2, p. 72-80,1999.
- LIU, G.Q.; DONG, J.; WANG, H.; HASHI, Y.; CHEN, S.Z. Comparison of two species of Notopterygium by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **EurJ Mass Spectrom**, v. 18, n. 1, p. 59-69, 2012.
- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, n. 2, p. 493-&, 1961.
- MCCLUNG, J. M.; DAVIS, J. M.; CARSON, J. A. Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 219-32, 2007.
- MCCROSKERY, S.; THOMAS, M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 6, p. 1135-47, 2003.
- MCINTOSH, L.M.; ANDERSON, J.E. Hypothyroidism pro- longs and increases *mdx* muscle precursor proliferation and delays myotube formation in normal and dystrophic limb muscle. **Bio- chem. Cell Biol.**, v. 73, p. 181–90, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review**, v. 43, n.2, p.109-42, 1991.

MORGAN, D. L.; PROSKE, U. Popping sarcomere hypothesis explains stretch-induced muscle damage. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 8, p. 541-45, 2004.

MORRIS, R.H; NEWTON, M. Magnetic Resonance Sensors. *Sensors*, v. 14, n. 11, p. 21722-25, 2014.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**, v. 6, p.3051-64, 1992.

NG, S.F., ROUSE, J.J., SANDERSON, F.D. Validation of a static *Franz* diffusion cell system for *in vitro* permeation studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1432-41, 2010.

NOGUCHI, S.; WAKABAYASHI, E.; IMAMURA, M.; YOSHIDA, M.; OZAWA, E. Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 3, p. 640-48, 2000.

PERNITSKY, A.N.; ANDERSON, J.E. Differential effects of 3,5,3-triiodothyronine on control and *mdx* myoblasts and fibro- blasts: Analysis by flow cytometry. **Exp. Cell Res.** v. 22, p. 214–22, 1996.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 115, n. 5, p. 359-72, 2001.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-65, 2003.

POULI, N.; ANTONIADOU-VYZAS, A.; FOSCOLOS, G. B. Methocarbamol degradation in aqueous solution. **J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 499– 501, 1994.

POWNALL, M. E.; GUSTAFSSON, M. K.; EMERSON, C. P. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 747-83, 2002.

RAYMENT, I., HOLDEN, H. M., WHITTAKER, M., YOHN, C. B., LORENZ, M., HOLMES, K. C., & MILLIGAN, R. A. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle-contraction. **Science**, v. 261, n. 5117, p. 58-65, 1993.

SCHULTZ, E.; GIBSON, M.C.; CHAMPION, T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. **J. Exp. Zool**, v. 206, p. 451-56, 1978.

SCHULTZ, E.; JARYSZAK, D. L. Effects of skeletal-muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 30, n. 1, p. 63-72, 1985.

SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Developmental Biology**, v. 218, n. 2, p. 115-24, 2000.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**, v. 20, n. 13, p. 1692-1708, 2006.

SQUIRE, J. M.; AL-KHAYAT, H. A.; KNUPP, C.; LUTHER, P. K. Molecular architecture in muscle contractile assemblies. **Fibrous Proteins: Muscle and Molecular Motors**, v. 71, p. 17-87, 2005.

TATSUMI, R.; ALLEN, R. E. Active hepatocyte growth factor is present in skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 30, p. 654-58, 2004.

TATSUMI, R.; ANDERSON, J. E.; NEVORET, C. J.; HALEVY, O.; ALLEN, R. E. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. **Dev. Biol.**, v. 194, p. 114-28, 1998.

TATSUMI, R.; HATTORI, A.; IKEUCHI, Y.; ANDERSON, J. E.; ALLEN, R. E. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 2909-18, 2002.

TATSUMI, R.; LIU, X.; PULIDO, A.; MORALES, M.; SAKATA, T.; DIAL, S.; HATTORI, A.; IKEUCHI, Y.; ALLEN, R. E. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. **Am. J. Physiol.**, v. 290, p. C1487-94, 2006.

TATSUMI, R.; SHEEHAN, S. M.; IWASAKI, H.; HATTORI, A.; ALLEN, R. E. Mechanical stretch induces activation of skeletal muscle satellite cells in vitro. **Exp. Cell Res.**, v. 267, p. 107-14, 2001.

WAGERS, A. J.; CONBOY, I. M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: Current concepts and controversies in adult myogenesis. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 659-67, 2005.

WANG et al., Development of a Nitric Oxide-Releasing Analogue of the Muscle Relaxant Guaifenesin for Skeletal Muscle Satellite Cell Myogenesis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, 2009.

WINK, D.A. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n.5, p.711-21, 1998.

WOZNIAK, A. C.; ANDERSON, J. E. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. **Dev. Dyn.**, v. 236, p. 240-50, 2007.

WOZNIAK, A. C.; ANDERSON, J. E. Single-fiber isolation and maintenance of satellite cell quiescence. **Biochem. Cell Biol.**, v. 83, p. 674-76, 2005.

WOZNIAK, A. C.; ANDERSON, J. E. The dynamics of the nitric oxide release-transient from stretched muscle cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, n. 3, p. 625-31, 2009.

WOZNIAK, A. C.; PILIPOWICZ, O.; YABLONKA-REUVENI, Z.; GREENWAY, S.; CRAVEN, S.; SCOTT, E.; ANDERSON, J. E. C-met expression and mechanical activation of satellite cells on cultured muscle fibers. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1437-45, 2003.

WOZNIAK, A. C.; PILIPOWICZ, O.; YABLONKA-REUVENI, Z.; GREENWAY, S.; CRAVEN, S.; SCOTT, E.; ANDERSON, J. E. C-Met expression and mechanical activation of satellite cells on cultured muscle fibers. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, p. 1437-45, 2003.

ZAMMIT, P. S.; GOLDING, J. P.; NAGATA, Y.; HUDON, V.; PARTRIDGE, T. A.; BEAUCHAMP, J. R. Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal. **Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 3, p. 347-57, 2004.