

Artigo de revisão

Jocimar Franco de Souza¹
Yoko Oshima-Franco¹
Nobel Penteado de Freitas¹

¹. Universidade de Sorocaba

KEY WORDS

Junção Neuromuscular; Preparação Nervo-Músculo; Camundongos; Bases de dados; Sinapses.

PALAVRAS-CHAVE

Neuromuscular Junction; Nerve-Muscle Preparation; Mice; Data base; Synapses.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Jocimar de Souza
<jocimar022desouza@gmail.com>
Rua Zínia, 124. Narita Garden. CEP:06730-000
Vargem Grande Paulista, SP, Brasil

A preparação nervo frênico-diafragma (camundongos/ratos) e a técnica miográfica como ferramenta farmacológica

The phrenic nerve-diaphragm preparation (mice/rats) and the myographic technique as a pharmacological tool

ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is formed by synapses between a motor nerve and a skeletal muscle. Pharmacological tests carried out at the NMJ are extremely important, as they allow testing, validating and studying the pharmacodynamic of various substances. A neuromuscular preparation widely used for this purpose is the *ex vivo* Phrenic Nerve-Diaphragm (PND) preparation. The aim of this work was to research the use of the PND preparation of mice/rats using myographic technique. The methodology used in the research was carried out using "rats or mouse phrenic nerve-diaphragm preparation" as descriptors, in the databases PubMed, Google Scholar, SciELO and CAPES Journals. The inclusion criteria were articles that used both, PND preparation and myographic technique, from 1946 to 2019. NMJ represents anatomically the nerve-muscle synapse, simple to be isolated and easy to be studied. There are several pharmacological protocols (pre-, post- and in the synaptic cleft) using these preparations through the myographic technique, with assertive results on the pharmacodynamics of certain substances. After the survey, the database in which more publications were obtained was Google Scholar, with an average of 29 articles per year (70% of publications), followed by the CAPES Journals with 11 articles per year on average (25.4% publications), PubMed with an average of two articles per year (4.2% of publications) and, finally, SciELO with an average of one article per year (0.4% of publications). In conclusion, the use of the PND preparation of mice/rats in the survey period shows that, despite the concern of the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA), research on animals was recurrent and of great importance. This robust experimental model has allowed to open perspectives for new questions in the field of science, and can be complemented with other tests such as biochemical, histological and immunohistochemical.

RESUMO

A junção neuromuscular (JNM) é formada por sinapses entre um nervo motor e um músculo esquelético. Ensaios farmacológicos realizados na JNM são de extrema importância, pois permitem testar, validar e estudar a farmacodinâmica de diversas substâncias. Uma preparação neuromuscular muito utilizada para este propósito é a preparação *ex vivo* Nervo Frênico-Diafragma (NFD). O objetivo deste trabalho foi pesquisar sobre o uso da preparação NFD de camundongos/ratos através de técnica miográfica. A metodologia empregada na pesquisa foi realizada utilizando-se "rats or mouse phrenic nerve-diaphragm preparation" como descritores, nas bases de dados PubMed, Google Acadêmico, SciELO e Periódicos CAPES. Os critérios de inclusão foram artigos que utilizaram ambos, preparação NFD e técnica miográfica, no período de 1946 a 2019. A JNM representa anatomicamente a sinapse nervo-músculo, simples de ser isolada e fácil de ser estudada. Há diversos protocolos farmacológicos (pré-, pós- e na fenda sináptica) utilizando-se essas preparações através da técnica miográfica, com resultados assertivos sobre a farmacodinâmica de determinadas substâncias. Feito o levantamento, a base de dados em que se obteve mais publicações foi o Google Acadêmico, com uma média de 29 artigos por ano (70% das publicações), seguida do Periódico CAPES com 11 artigos por ano em média (25,4% das publicações), PubMed com média de dois artigos por ano (4,2% das publicações) e, enfim, SciELO com média de um artigo por ano (0,4% das publicações). Em conclusão, o uso da preparação NFD de ratos/camundongos no período levantado mostra que, mesmo com a preocupação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), as pesquisas com animais foram recorrentes e de grande importância. Este robusto modelo experimental tem permitido abrir perspectivas para novas perguntas na área da ciência, podendo ser complementado com outros ensaios como bioquímicos, histológicos e imunohistoquímicos.

INTRODUÇÃO

As junções neuromusculares são formadas por sinapses entre um nervo motor espinhal e um músculo esquelético (ITO et al., 2018). Essa maquinaria nervo-músculo, quando isolada na forma de preparação biológica, constitui um modelo farmacológico *ex vivo*, que permite testar, validar e conhecer a farmacodinâmica de substâncias, sendo de extremo valor científico. A ciência básica representa o início de uma pesquisa, conforme ilustra a Figura 1, através da experimentação *in vitro*, *ex vivo*, ou *in vivo*, visando à obtenção do máximo de informações e tornando mais completo o estudo sobre determinado composto.



Figura 1. Escala de etapas para a pesquisa. M. A.: Meta-análise

Um dos experimentos utilizados para dar início a ensaios mais aprofundados é a Preparação Nervo Frênico-Diafragma, através de técnica miográfica, que se enquadra nos estudos em animais, segundo nível da pirâmide, descrita acima. Desde a sua adaptação de ratos para camundongos, por Bühlbring (1946), a preparação é grandemente usada para verificar ações de compostos orgânicos e inorgânicos na junção neuromuscular.

O estudo *in vitro* é de suma importância, pois analisa ações e fatos detalhados das substâncias e, além disso, o seu grande uso é caracterizado pelo fato de não utilizar animais. Ao contrário disso, e um patamar acima na escala (Figura 1), o uso de animais, em laboratório, é igualmente importante, pois, nesse local, mantém-se e simulam-se as atividades biológicas dos ensaios de maior escala.

O estudo farmacológico, na preparação nervo frênico-diafragma (*ex vivo*), leva em consideração a fisiologia e anatomia da junção neuromuscular, sendo investigadas as drogas com atividade pré- e/ou pós-sináptica, assim como as atividades na fenda sináptica.

Observando esses aspectos, o objetivo geral desta revisão foi realizar um levantamento acerca do uso da preparação nervo-frênico diafragma de camundongos/ratos, através da técnica miográfica.

DESENVOLVIMENTO

METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento de dados sobre o uso da preparação nervo frênico diafragma (ratos ou camundongos), através de técnica miográfica convencional, sobre o seu uso corrente desde o ano em que foi descrito o isolamento desta preparação (1946) até 2019. Utilizaram-se como busca as palavras-chave “rats or mouse phrenic nerve-diaphragm preparation” em bases de dados como: PubMed, Google Scholar, SciELO e Periódicos CAPES. Para seleção das publicações, utilizou-se como critério de inclusão os artigos que usaram apenas a técnica miográfica, excluindo assim as publicações que utilizaram outros ensaios associados.

FISIOLOGIA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Os neurônios compartilham muitas características das demais células presentes no organismo. Porém, como cada conjunto exerce funções específicas, as células neuronais não são diferentes. Os neurônios tem a capacidade de se comunicarem com mais precisão e velocidade que as demais, mas isto ainda é dependente do tipo de neurônio e espécie animal variando entre 0,1 m/s e 120 m/s (MOREIRA, 2013).

As sinapses entre nervo-músculo são as mais simples e fáceis de serem estudadas por serem químicas, a exemplo do que ocorre no interior do encéfalo (sinapses nervo-nervo). No cérebro, também ocorre a sinapse elétrica, conhecida como junção comunicante (gapjunction). As junções neuromusculares (JNM), pela sua natureza química e pela facilidade de obtenção para experimentação, constituem-se preparações ideais para um estudo farmacológico. Outras características que facilitam o estudo nessa região são: as células musculares são maiores que as outras, facilitando acomodações de dois ou mais eletrodos para estudos elétricos; as células musculares recebem apenas um axônio pré-sináptico; a liberação de um neurotransmissor abre apenas um tipo de canal iônico pós-sináptico (KANDEL et al., 2014).

A célula neural se conecta com a membrana da célula muscular em regiões específicas denominadas placas motoras. Nesses pontos, formam-se os botões sinápticos, locais nos quais acontecem as transmissões sinápticas (Figura 2). Os botões sinápticos estão dispostos em regiões especializadas sobre a placa motora, separados por uma fenda sináptica de aproximadamente 100 nm (nanômetros). Nessas regiões existem invaginações (dobras juncionais) e, em suas cristas, situam-se os receptores nicotínicos da acetilcolina (ACh). Na fenda sináptica, há uma membrana composta por colágeno e outras substâncias do material extracelular, onde está situada a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise da ACh para formar colina e ácido acético. No fundo de cada dobra juncional, estão os canais de Na^+ (sódio) dependentes de voltagem (Figura 2). Nos botões sinápticos, estão os canais de Ca^{2+} (cálcio) fixados em sua membrana.

A liberação de ACh se dá quando o potencial de ação é deflagrado e o impulso nervoso chega ao terminal nervoso, em que ocorre o influxo de cálcio (Ca^{2+}) para dentro do terminal, culminando no processo de exocitose. No momento que isso acontece, o neurotransmissor se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos, abrindo-os e permitindo o fluxo de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} através do receptor.

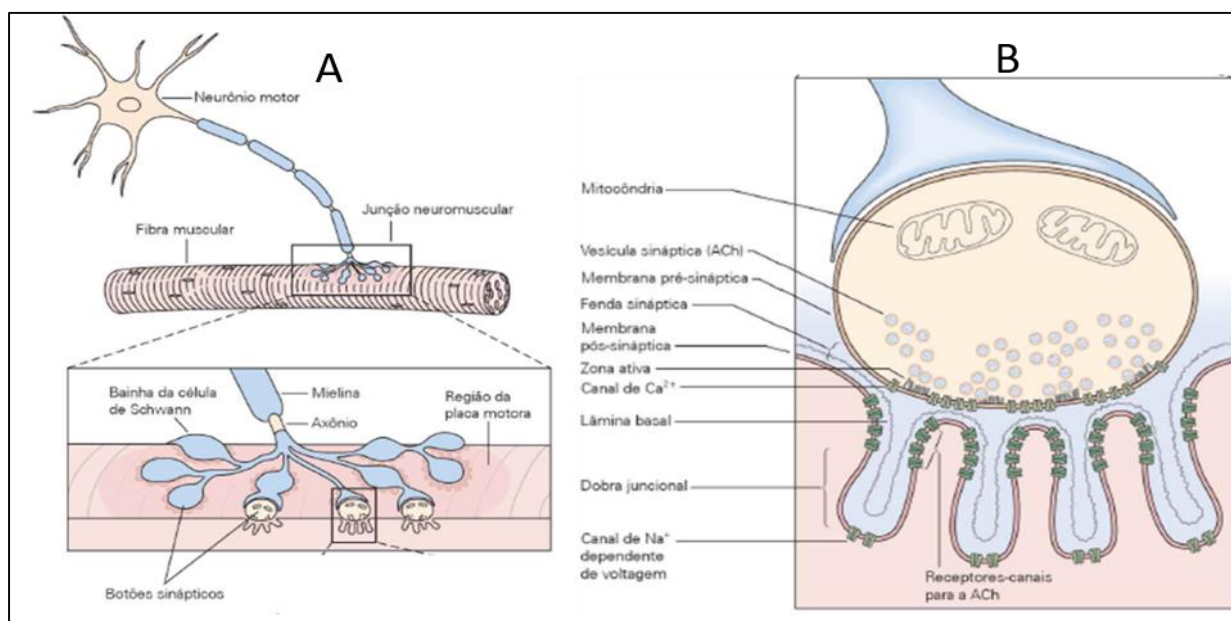


Figura 2. Junção neuromuscular (A), botão sináptico e dobras juncionais (B). (KANDEL *et al.*, 2014)

Por esse processo, o influxo de Na^+ produz uma despolarização na membrana da fibra motora se denominando potencial de placa motora (PPM).

Por estarem todos concentrados na placa motora, os canais ligados por ACh causam apenas uma despolarização que se espalha de modo passivo pela fibra muscular, porém esta despolarização tem uma grande intensidade, causando, em um indivíduo normal, a ultrapassagem do limiar (Figura 3).

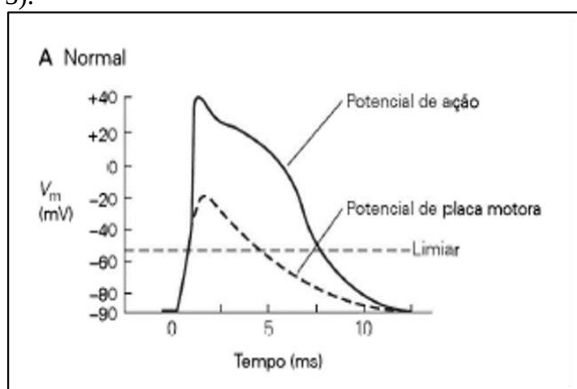


Figura 3. Despolarização de placa motora em um indivíduo normal. (KANDEL *et al.*, 2014).

Por ser acessível e ter sua natureza química, como foi dito, a sinapse nervo-músculo é de fácil isolamento para estudos farmacológicos. Um exemplo disso é o uso do curare (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006) no estudo da JNM (Figura 4). Essa substância ocupa os receptores colinérgicos de ACh, impedindo que a ACh se ligue ao seu receptor, sendo considerado um antagonista competitivo da ACh.

PROTOCOLOS UTILIZADOS NA JNM

Há diversos protocolos farmacológicos para a utilização da técnica miográfica. As substâncias podem agir em nível pré, pós ou na fenda sináptica. Drogas que atuam pré-sinápticamente são aquelas que tem sua função no terminal nervoso. Tais substâncias podem agir na inibição ou

ativação da produção de ACh, diminuindo ou aumentando seu nível de liberação (SANNOMIYA; MANREZA; ZANINI, 1975). Exemplos de drogas inibidoras que agem pré-sinápticamente são as toxinas botulínicas e o hemicolinio, responsáveis por inibir a liberação e inibição da síntese de ACh, respectivamente.

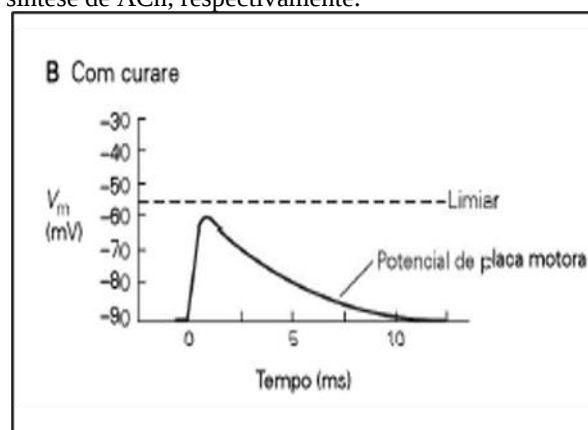


Figura 4. Despolarização de placa motora com curare. (KANDEL *et al.*, 2014).

Os protocolos farmacológicos pós-sinápticos destinam-se a pesquisar substâncias que agem na placa motora. As drogas que agem pós-sinápticamente tendem a atuar em conjunto aos receptores colinérgicos inibindo a ligação de ACh. Duas formas de acontecer o bloqueio neuromuscular podem ser exemplificadas pelas drogas despolarizantes e pelas drogas competitivas ou não despolarizantes. A primeira age no bloqueio por despolarização prolongada, enquanto as segundas agem combinando-se com os receptores da placa motora, não modificando o potencial de repouso, causando o relaxamento direto (SANNOMIYA; MANREZA; ZANINI, 1975). Exemplos de drogas que exercem funções pós-sinápticamente são: succinilcolina (suxametônio) e decametônio, que causam a despolarização prolongada; d-tubocurarina e dimetilubocurarina, que interagem de modo competitivo com os receptores, causando o bloqueio neuromuscular.

As drogas despolarizantes tem o mesmo princípio de ação que a ACh nos receptores colinérgicos, ou seja, ativadas, porém elas tem uma característica determinante em seu mecanismo, são mais resistentes às AChE's causando, então, uma despolarização mais prolongada, podendo acarretar, em alguns animais, inclusive o ser humano, a fase II do bloqueio, ou seja, a ação termina, mas o bloqueio persiste (RANGEL-YAGUI, 2007).

As drogas não despolarizantes agem competitivamente com a ACh, não a deixando se ligar ao receptor e, consequentemente, impedindo a despolarização da placa motora. Dessa forma, há uma gradual redução no potencial de placa terminal (PPT), até ela não atingir o limiar e não disparar um potencial de ação para haver a contração muscular (APPIAH-ANKAM; HUNTER, 2004).

Estudos na fenda sináptica caracterizam-se principalmente por fármacos que têm ação sobre a enzima AChE, responsável pela hidrólise da ACh. Uma substância conhecida, na literatura, por ter ação anticolinesterásica é a neostigmina, sendo um inibidor de AChE (HERMAN *et al.*, 2018; KOCSIS *et al.*, 2014). Porém, não apenas a neostigmina se caracteriza como inibidor de AChE, a literatura cita também donepezil (KOCSIS *et al.*, 2014), compostos híbridos de tacrina-curcumina (LIU *et al.*, 2017), galantamina, rivastigmina e tacrina (SEIDL, 2010).

ESTUDOS USANDO OS PROTOCOLOS NA JNM

O estudo na JNM de substâncias em geral é de suma importância, principalmente com os ensaios na preparação nervo frênico-diafragma de ratos/camundongos, pois a técnica permite resultados, muitas vezes, assertivos de como determinada substância, seja ela pura ou em mistura, age nos sítios de ação da JNM, ou seja, pré-sináptico, fenda sináptica, pós-sináptico.

Desde sua adaptação em camundongos (BÜLBRING, 1946), muitos pesquisadores utilizaram dessa técnica para determinar os sítios funcionais de substâncias ou mecanismos de bloqueio neuromuscular (COLLAÇO *et al.*, 2017). Na Tabela 1, estão descritos os principais estudos utilizando a preparação NFD de camundongos nos últimos cinco anos.

Muitos dos trabalhos estudados sempre relacionam alguma substância que possa inibir a ação bloqueadora de algum veneno (AIRD *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2016; RESENDE *et al.*, 2017; THYAGARAJAN *et al.*, 2017), porém há aqueles também que são feitos para estudar a própria junção nervo músculo (NURULLIN; NIKOLSKY; MALOMOUZH, 2018; WILLADT; NASH; SLATER, 2016; GHALI, 2017).

Assim, essa técnica pode ser utilizada com vários propósitos de estudo, sendo eficaz em todos eles.

Autor(es)	Título	Material Testado			
(BRAGA <i>et al.</i> , 2015)				Effect of 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture combined with pancuronium on neuromuscular transmission in rat phrenic nerve-diaphragm preparation; a pilot study	Mistura com 50% de excesso de bupivacaína com pancunônio
(CHEN <i>et al.</i> , 2014)				Dexamethasone-induced hyposensitivity to rocuronium in rat diaphragm associated with muscle-fiber transformation	Hipossensibilidade induzida pela dexametasona ao rocurônio
(FÁBIÁN <i>et al.</i> , 2019)				The effect of magnesium on the reversal of rocuronium-induced neuromuscular block with sugammadex: an <i>ex vivo</i> laboratory study	Efeito do magnésio na reversão do rocurônio
(CHO <i>et al.</i> , 2018)				The effect of magnesium sulfate concentration on the effective concentration of rocuronium, and sugammadex-mediated reversal, in isolated left phrenic nerve hemi-diaphragm preparations from the rat	Sulfato de magnésio contra rocurônio
(ZHAO <i>et al.</i> , 2016)				Chemical Components and Pharmacological Activities of Terpene Natural Products from the Genus <i>Paeonia</i>	Terpenos naturais de plantas do gênero <i>Paeonia</i>
(HERRERA <i>et al.</i> , 2016)				Neutralization of the neuromuscular inhibition of venom and taipoxin from the taipan (<i>Oxyuranus scutellatus</i>) by F(ab') ₂ and whole IgG antivenoms	Taipoxina (<i>Oxyuranus scutellatus</i>) e antivenenos IgG
(ROSTELATO-FERREIRA <i>et al.</i> , 2014)	Presynaptic neuromuscular action of a methanolic extract from the venom of <i>Rhinella schneideri</i> toad	Extrato Metanólico com veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	(COLLAÇO <i>et al.</i> , 2017)	<i>Bothrops fonsceai</i> snake venom activities and cross-reactivity with commercial bothropic antivenom	Antiveneno botrópico comercial contra o veneno de <i>B. fonsceai</i>

(HARDER <i>et al.</i> , 2017)	Pharmacological Properties of <i>Vochysia haenkeana</i> (Vochysiaceae) Extract to Neutralize the Neuromuscular Blockade Induced by Bothropstoxin-I (Lys49 Phospholipase A2) Myotoxin	Extrato de <i>Vochysia haenkeana</i>	(ITO <i>et al.</i> , 2018)	Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters	Estudo da falta de Fgf18
(PIMENTEL <i>et al.</i> , 2016)	Atropine is more efficient than ZM241385 to reduce a drastic level of fade caused by cisatracurium at 50 Hz	Efeito da atropina	(STOJILJKOVIC <i>et al.</i> , 2019)	Prophylactic potential of memantine against soman poisoning in rats	Estudo da memantina contra intoxicação
(NURULLIN, NIKOLSKY e MALOMOUZH, 2018)	Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction	Mecanismo molecular GABAérgico	(DIAS <i>et al.</i> , 2016)	Pharmacological analysis of hemodynamic responses to <i>Lachesis muta</i> (South American bushmaster) snake venom in anesthetized rats	Resposta hemodinâmica do veneno de <i>L. muta</i> em ratos anestesiados
(RESENDE <i>et al.</i> , 2017)	Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A2, AplTx-I, purified from <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> snake venom	Ácido fosfolipase A2, AplTx-I	(STOJILJKOVIĆ <i>et al.</i> , 2018)	Efficacy of antidotes and their combinations in the treatment of acute carbamate poisoning in rats	Antídotos contra envenenamentos por carbamatos
(NAGHDI <i>et al.</i> , 2018)	Muscarinic receptors, nitric oxide formation and cyclooxygenase pathway involved in tracheal smooth muscle relaxant effect of hydro-ethanolic extract of <i>Lavandula angustifolia</i> flowers	Extrato hidroalcoólico de flores de <i>L. angustifolia</i>	(THYAGARAJAN <i>et al.</i> , 2017)	Perturbation to Cholesterol at the Neuromuscular Junction Confers Botulinum Neurotoxin A Sensitivity to Neonatal Mice	Colesterol contra a BoTx/A na JNM de camundongos neonatal
(WILLADT, NASH e SLATER, 2016)	Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm	Metodo fisiológico da junção nervo muscular	(GHALI, 2017)	The crossed phrenic phenomenon	Estudo de disfunção respiratória
(IVANOVIC <i>et al.</i> , 2016)	Downregulation of nicotinic and muscarinic receptor function in rats after subchronic exposure to diazinon	Diazinon	(KAMARUDIN <i>et al.</i> , 2017)	Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of <i>Clinacanthus nutans</i> (Burm. f.) Lindau: A comprehensive review	Usos da <i>Clinacanthus nutans</i>
			(RAMESHRAD, RAZAVI e HOSSEINZADEH, 2016)	Protective effects of green tea and its main constituents against natural and chemical toxins: A comprehensive review	Efeitos chá verde
			(AIRD <i>et al.</i> , 2017)	Coralsnake Venomics: Analyses of Venom Gland Transcriptomes and Proteomes of Six Brazilian Taxa	Transcriptomas e proteomas
			(FERRAZ <i>et al.</i> , 2014)	An Isoflavone from <i>D. alata</i> Vogel is Active against the <i>in</i>	Isoflavonoides contra BthTX- I

	Vitro Neuromuscular Paralysis of <i>B. jararacussu</i> Snake Venom and Bt h TX-I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis	
(FERREIRA-RODRIGUES <i>et al.</i> , 2016)	Anti-Inflammatory and Antibothropic properties of <i>Jatropha elliptica</i> , a from brazilian cerrado biome	Extrato de <i>J. elliptica</i>
(TRIBUIANI <i>et al.</i> , 2017)	Neutralising ability of <i>Terminalia fagifolia</i> extract (Combretaceae) against the in vitro neuromuscular effects of <i>Bothrops jararacussu</i> venom	Extrato de <i>T. fagifolia</i> .
(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018)	Activity of silver nanoparticles on prokaryotic cells and <i>Bothrops jararacussu</i> snake venom	Nanopartículas de prata

A TÉCNICA

A técnica da preparação utilizada por pesquisadores, na atualidade, foi adaptada de Bülbüling (1946), sendo descrita da seguinte forma: Os camundongos são anestesiados com substâncias aprovadas pelo CEUA, por via inalatória ou intraperitoneal e, posteriormente, exsanguinados por secção e sangria dos vasos cervicais. A dissecação da preparação

ganchos existentes na base da cuba. A temperatura é mantida a 37°C e a preparação saturada com carbogênio (composto por 95% de O₂ e 5% de CO₂). Aplica-se uma tensão sobre porção muscular (diafragma). O nervo frênico fica sobreposto a um eletrodo e em contato com a superfície da solução nutritiva. A preparação é estimulada indiretamente, através do nervo frênico, utilizando estimuladores fisiológicos, estímulos supraximais. O registro da contração muscular é produzido através de transdutores isométricos, acoplado a um fisiógrafo, contendo amplificadores. A preparação pode ser feita também por estímulos diretos através do músculo diafragma.

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Os experimentos feitos com a preparação NFD de camundongo/rato são expressos de forma isolada (Figura 5), ou seja, representando cada experimento em si completando os (n) de cada grupo estudado, por exemplo, um ensaio necessita de, no mínimo, cinco a seis repetições para uma resposta estatisticamente confiável, cada repetição é um “n” do grupo.

Tais resultados são emitidos do equipamento miográfico, em registros que representam as contrações musculares dadas pelos estímulos constantes, gerados pelo estimulador ou registrados em computador, se o sistema miográfico possuir um sistema digital de aquisição de dados.

Para fazer a análise estatística dos experimentos, os (n) precisam ser compilados. Após a compilação dos mesmos, a melhor forma de representar e analisar é construir gráficos de linhas (Figura 6), sendo o eixo “X” dado o tempo em minutos (min) e o eixo “Y” a porcentagem de contração muscular.

Neste gráfico, o 100% representa o grupo controle, ou seja, o grupo cujo experimento foi executado apenas na

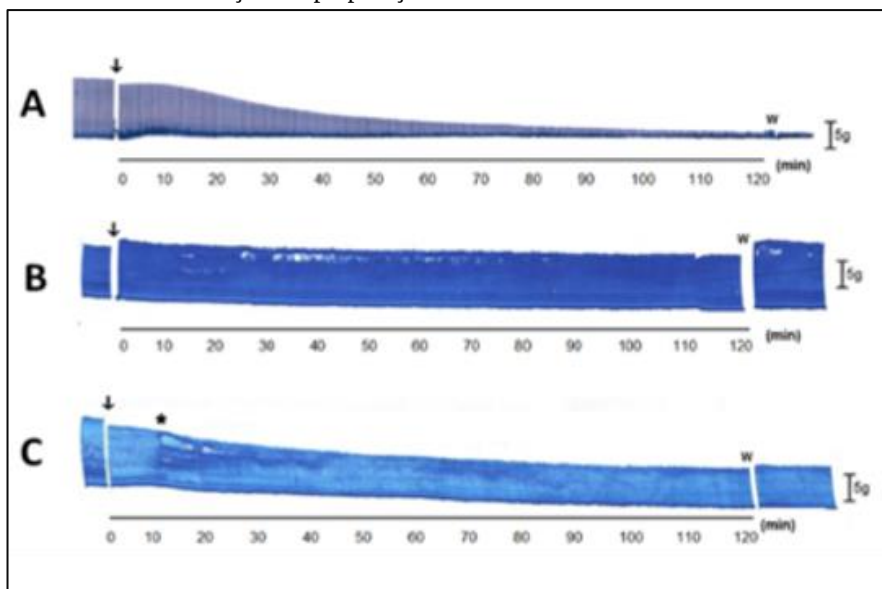


Figura 5. Expressão dos resultados de forma isolada. (FERRAZ *et al.*, 2014).

nervo frênico-diafragma, então, é feita e colocada em cuba de acrílico com capacidade para manter a preparação submersa durante o ensaio, contendo solução nutritiva de Tyrode ou Krebs, conforme o ensaio que será feito pelo pesquisador e, presa através dos músculos da costela por

solução de Tyrode, sendo as demais curvas os grupos específicos de soluções.

De forma isolada, também é possível se ver uma resposta de bloqueio das contrações como dado na Figura 7.

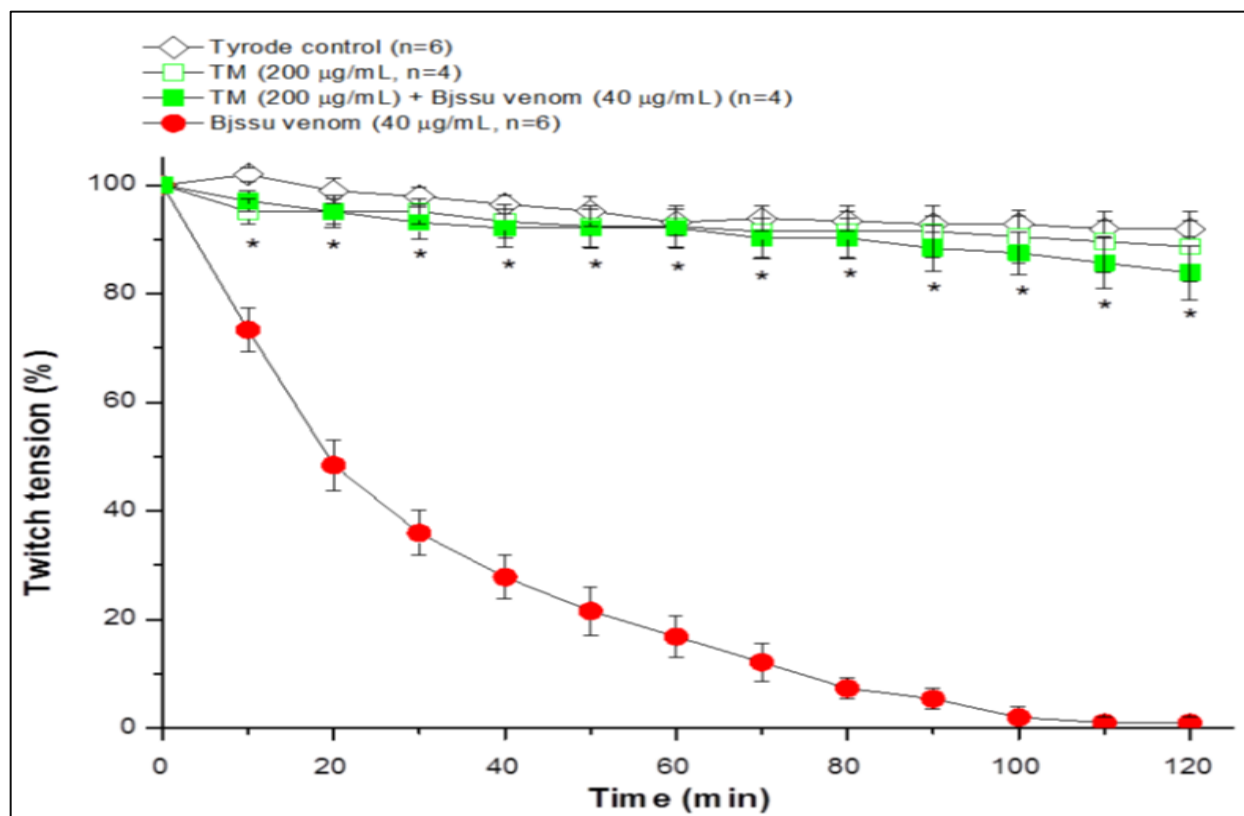


Figura 6. Expressão dos resultados compilados. (FERRAZ *et al.*, 2014).

LEVANTAMENTO QUANTITATIVO

Para analisar a importância da utilização da técnica de preparação NFD, foi de grande interesse que se fizesse um levantamento em bases de dados, tais como Google Acadêmico, SciElo, PubMed e Periódicos CAPES com as palavras-chave “rats or mouse phrenic nerve-diaphragm preparation”.

Após o levantamento, os dados foram tabulados e demonstrados, na Figura 8, o intervalo de tempo utilizado foi de 10 anos, desde a adaptação feita por Bülbbring (1946) até o momento presente, 2019.

Observando minuciosamente o gráfico acima, pode-se notar que o uso da técnica foi aumentando ao longo dos anos, conforme foi sendo divulgada, e por ser o Google Acadêmico a base de dados mais acessível é onde se tem mais publicações com uma média de 29 artigos por ano (70% das publicações), seguida do Periódicos CAPES com 11 artigos por ano em média (25,4% das publicações), PubMed com média de dois artigos por ano (4,2% das publicações) e SciElo com média de um artigo por ano (0,4% das publicações).

O que pode ser inferido também, ao analisar o gráfico, é o fato de que, com o passar dos anos, a tecnologia foi se

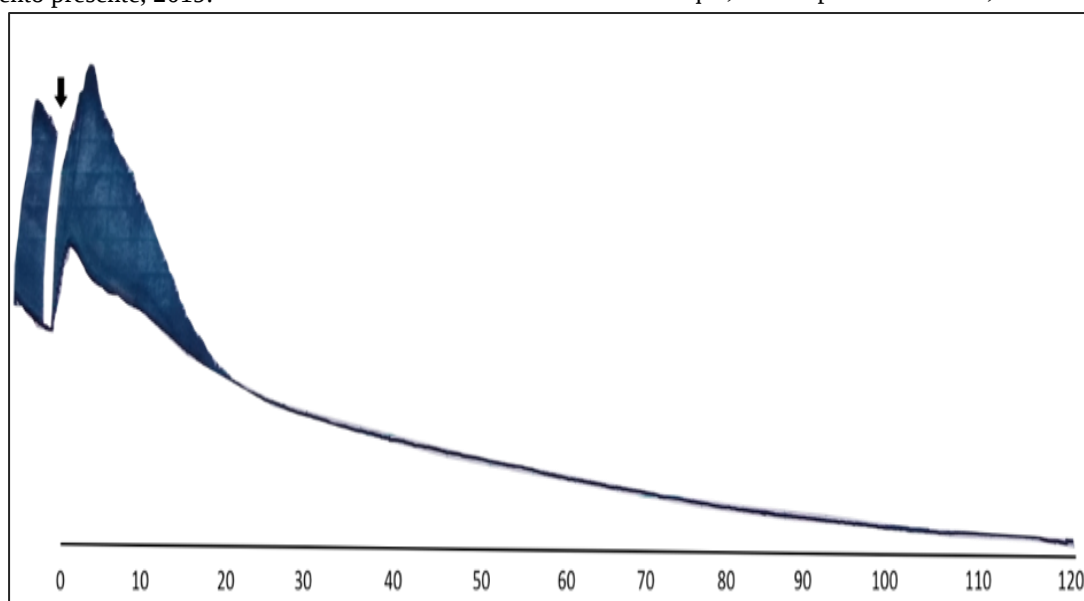


Figura 7. Representação isolada de um bloqueio na junção neuromuscular (JNM) por veneno de *B. jararacussu*.

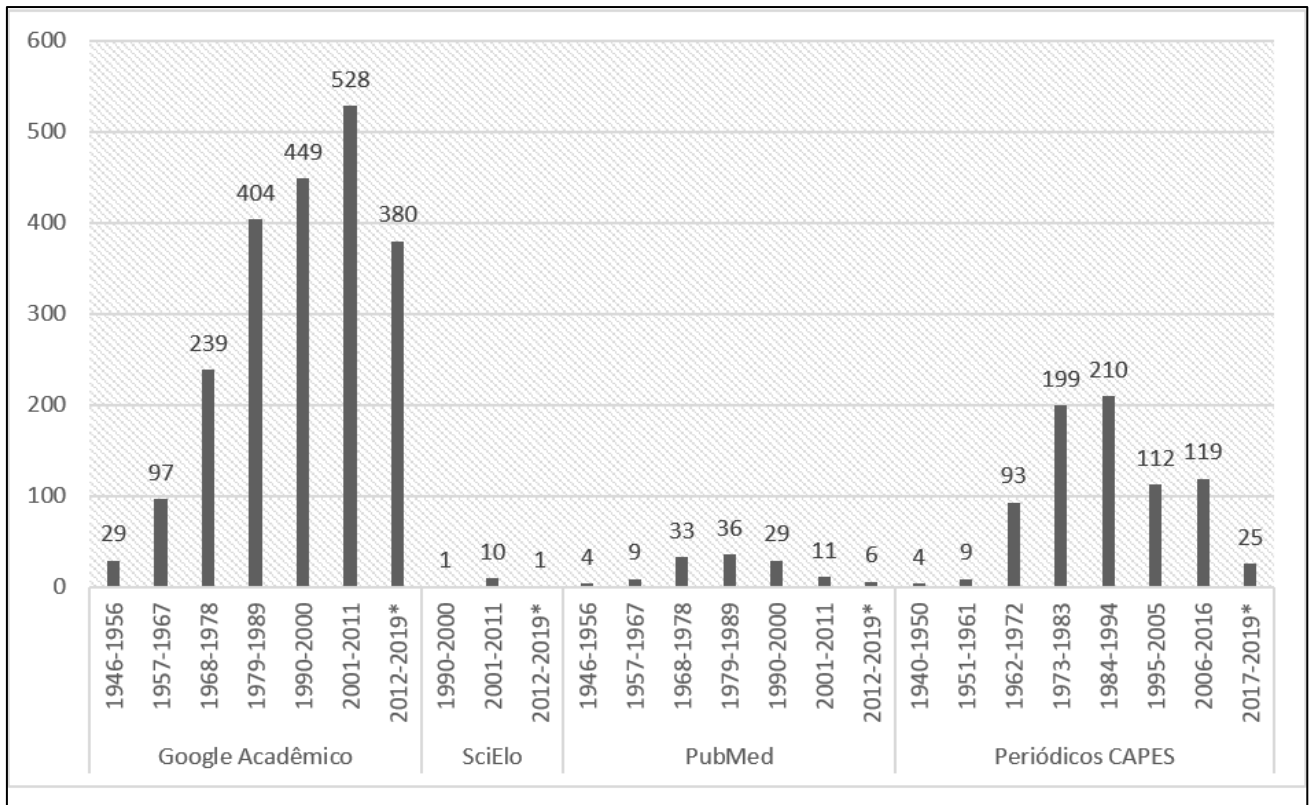


Figura 8. Levantamento quantitativo do uso da preparação nervo frênico diafragma (NFD). *: período com menos de 10 anos.

aprimorando e tornando-se mais acessível igualmente à execução da técnica, sendo o maior número de publicações a partir dos anos 2000.

Com o desenvolvimento mais acelerado da tecnologia, nos últimos anos, a tendência ainda é aumentar o uso desta técnica como mostrados na Figura 9.

CONCLUSÃO

Tendo observado todo o período levantado com o uso da técnica de preparação NFD de ratos/camundongos pode ser notado que, mesmo com a grande preocupação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), tais

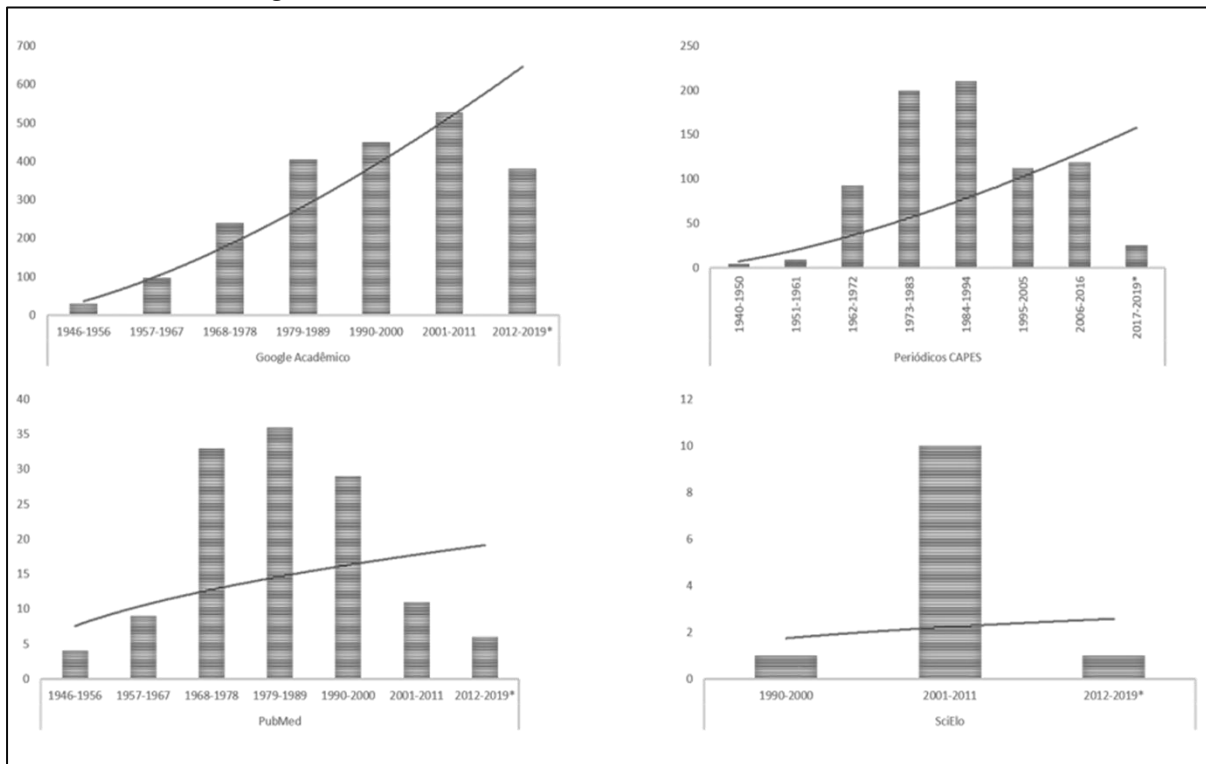


Figura 9. Tendência do uso da técnica de preparação nervo frênico diafragma (NFD).

pesquisas são recorrentes e de grande importância, pois uma técnica como esta abre perspectivas para novas perguntas na área da ciência. Além disso, os músculos resultantes podem ser analisados através de técnicas de microscopia (de luz, eletrônica, confocal, etc.) e dos seus banhos nutritivos, coletar-se amostras para dosagens bioquímicas (creatinoquinase, desidrogenase láctica, estresse oxidativo, etc.), e até mesmo estudos imunohistoquímicos.

REFERÊNCIAS

- AIRD, S. D. *et al.* Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. **Toxins**, v. 9, n. 6, p. 1–64, 2017.
- APPIAH-ANKAM, J.; HUNTER, J. M. Pharmacology of neuromuscular blocking drugs. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 4, n. 1, p. 2–7, 2004.
- BRAGA, A. D. F. D. A. *et al.* Effect of 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture combined with pancuronium on neuromuscular transmission in rat phrenic nerve-diaphragm preparation; a pilot study. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 59, p. 701-5, 2015. doi: 10.4103/0019-5049.170019
- BULBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 1, p. 38–61, 1946.
- CHEN, D. *et al.* Dexamethasone-induced hyposensitivity to rocuronium in rat diaphragm associated with muscle-fiber transformation. **Molecular Medicine Reports**, Shanghai, v. 9, p. 527-534, 2014.
- CHO, C.-K. *et al.* The effect of magnesium sulfate concentration on the effective concentration of rocuronium, and sugammadex-mediated reversal, in isolated left phrenic nerve hemidiaphragm preparations from the rat. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 71, n. 05, p. 401-406, 2018.
- COLLAÇO, R. de C. O. *et al.* *Bothrops fonsecai* snake venom activities and cross-reactivity with commercial bothropic venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 191, p. 86–100, 2017.
- DIAS, L. *et al.* Pharmacological analysis of hemodynamic responses to *Lachesis muta* (South American bushmaster) snake venom in anesthetized rats. **Toxicon**, v. 123, p. 25–44, 2016.
- FÁBIÁN, Á. I. *et al.* The effect of magnesium on the reversal of rocuronium-induced neuromuscular block with sugammadex: an ex vivo laboratory study. **BMC Anesthesiology**, v. 19, n. 64, p. 1-8, 2019.
- FERRAZ, M. C. *et al.* An isoflavone from *Dipteryx alata* vogel is active against the *in vitro* neuromuscular paralysis of *Bothrops jararacussu* snake venom and bothropstoxin-I, and prevents venom-induced myonecrosis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5790–5805, 2014.
- FERREIRA-RODRIGUES, S. C. *et al.* Anti-Inflammatory and Antibothropic Properties of *Jatropha elliptica*, a Plant from Brazilian Cerrado Biome. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 4, p. 573–579, 2016.
- GHALI, M. G. Z. The crossed phrenic phenomenon. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 6, p. 845–864, 2017.
- HARDER, *et al.* Pharmacological Properties of *Vochysia Haenkeana* (Vochysiaceae) Extract to Neutralize the Neuromuscular Blockade Induced by Bothropstoxin-I (Lys49 Phospholipase A2) Myotoxin. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 9, p. 433-439, 2017.
- HERMAN, A. P. *et al.* Neostigmine attenuates proinflammatory cytokine expression in preoptic area but not choroid plexus during lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 9150207, 2018. doi: 10.1155/2018/9150207. eCollection 2018.
- ITO, K. *et al.* Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 434, 2018. doi: 10.1038/s41598-017-18753-5.
- IVANOVIC, S. R. *et al.* Downregulation of nicotinic and muscarinic receptor function in rats after subchronic exposure to diazinon. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 523–530, 2016.
- KAMARUDIN, N. A. *et al.* Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 245-266, 2017.
- KANDEL, E. R. *et al.* **Princípios de Neurociências**. 5. ed. Porto Alegre: [s.n.]. 2014
- KOCSIS, P. *et al.* Vascular action as the primary mechanism of cognitive effects of cholinergic, CNS-acting drugs, a rat pHMRI BOLD study. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 34, n. 6, p. 995–1000, 2014.
- LIU, Z. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of multifunctional tacrine-curcumin hybrids as new cholinesterase inhibitors with metal ions-chelating and neuroprotective property. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 2387–2398, 2017.
- MOREIRA, C. Neurônio. **Revista de Ciência Elementar**, v. 1, n. 1, p. 0006, 2013.
- NAGHDI, F. *et al.* Muscarinic receptors, nitric oxide formation and cyclooxygenase pathway involved in tracheal smooth muscle relaxant effect of hydro-ethanolic extract of *Lavandula angustifolia* flowers. **Biomedicine &**

Pharmacotherapy, v. 102, p. 1221-1228, 2018.

NURULLIN, L. F.; NIKOLSKY, E. E.; MALOMOUZH, A. I. Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 298–301, 2018.

OLIVEIRA, I. C. F. et al. Activity of silver nanoparticles on prokaryotic cells and *Bothrops jararacussu* snake venom. **Drug And Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 1–5, 2018.

PIMENTEL, A. L. et al. Atropine is more efficient than ZM241385 to reduce a drastic level of fade caused by cisatracurium at 50 Hz. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 2, p. 165-171, 2016.

RAMESHRAD, M. ; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. Protective effects of green tea and its main constituents against natural and chemical toxins: A comprehensive review. **Food and Chemical Toxicology**, p. 115-137, 2016.

RANGEL-YAGUI, C. DE O. Farmacologia integrada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 489–489, 2007.

RESENDE, L. M. *et al.* Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A2, AplTx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom. **Toxicon**, v. 127, p. 22–36, 2017.

ROSTELATO-FERREIRA, S. et al. Presynaptic neuromuscular action of a methanolic extract from the venom of *Rhinella schneideri* toad. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 30, p. 1-5, 2014.

SANNOMIYA, P.; MANREZA, L. A.; ZANINI, A. C. FARMACOLOGIA DA UNIDADE MOTORA ASPECTOS DE INTERESSE EM NEUROLOGIA. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 33, n. 3, p. 252–260, 1975.

SEIDL, C. **PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS INIBIDORAS DA ACETILCOLINESTERASE CURITIBA**. Curitiba: [s.n.]. 2010.

STOJILJKOVIC, M. P. et al. Efficacy of antidotes and their combinations in the treatment of acute carbamate poisoning in rats. **Toxicology**, p. 2-60, 2018.

STOJILJKOVIC, et al. Prophylactic potential of memantine against soman poisoning in rats. **Toxicology**, p. 2-66, 2019.

THYAGARAJAN, B. *et al.* Perturbation to cholesterol at the neuromuscular junction confers botulinum neurotoxin A sensitivity to neonatal mice. **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 1, p. 179–188, 2017.

TRIBUIANI, N. et al. Neutralising ability of *Terminalia fagifolia* extract (Combretaceae) against the in vitro neuromuscular effects of *Bothrops jararacussu* venom. **Natural Product Research**, v. 31, n. 23, p. 2783–2787, 2017.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WILLADT, S.; NASH, M.; SLATER, C. R. Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24849, 2016.

ZHAO, D.-D. et al. Chemical Components and Pharmacological Activities of Terpene Natural Products from the Genus *Paeonia*. **Molecules**, v. 21, n. 1362, p. 1–14, 2016.