



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

MATHEUS ROCHA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO POTENCIAL ANESTÉSICO DA
NEOSAXITOXINA EM BLOQUEIOS PERINEURAIS**

Presidente Prudente
2025



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

MATHEUS ROCHA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO POTENCIAL ANESTÉSICO DA
NEOSAXITOXINA EM BLOQUEIOS PERINEURAIS**

Defesa da Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia e Saúde Animal. Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Dra. Sílvia Maria Caldeira
Franco Andrade

636.089
R484a

Ribeiro, Matheus Rocha.

Avaliação in vitro e in vivo do potencial anestésico da neosaxitoxina em bloqueios perineurais / Matheus Rocha Ribeiro. - Presidente Prudente, 2025.
82f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2025.

Bibliografia.

Orientador: Sílvia Maria Caldeira Franco Andrade

1. Analgesia. 2. Úlcera de córnea. 3. Cão. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO POTENCIAL ANESTÉSICO DA NEOSAXITOXINA EM BLOQUEIOS PERINEURAIS"

AUTOR(A): MATHEUS ROCHA RIBEIRO

ORIENTADOR(A): Profa. Dra. SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR(A) em FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. GLAUCIA PRADA KANASHIRO

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Prof. Dr. GUILHERME SCHIESS CARDOSO

UEL - Universidade Estadual de Londrina (PR)

Profa. Dra. RENATA NAVARRO CASSU

UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" / Botucatu (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 05 de agosto de 2025.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 06/08/2025 09:22
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 5
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6239458)

Signatários do documento

ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (COORDENADOR DE CURSO)

rosa@unoeste.br
Recebido em 06/08/2025 09:22
Assinado em 07/08/2025 08:18
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.33.2
ID da assinatura: 5397884

SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE (PROFESSOR)

silviafranco@unoeste.br
Recebido em 06/08/2025 09:22
Assinado em 06/08/2025 10:30
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.39.1
ID da assinatura: 5397883

GLAUCIA PRADA KANASHIRO (PROFESSOR)

prada@unoeste.br
Recebido em 06/08/2025 09:22
Assinado em 07/08/2025 07:57
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.33.2
ID da assinatura: 5397885

GUILHERME SCHIESS CARDOSO (SIGNATÁRIO EXTERNO)

schiess@uel.br
Recebido em 06/08/2025 09:22
Assinado em 07/08/2025 08:38
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 200.155.43.128
ID da assinatura: 5397887

RENATA NAVARRO CASSU (SIGNATÁRIO EXTERNO)

renata.navarro@unesp.br
Recebido em 06/08/2025 09:22
Assinado em 07/08/2025 08:54
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 186.217.26.163
ID da assinatura: 5397886

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/d2d16b08>

Assinatura digital do documento: 6341bb44cb8bc2127b83346113e20835228d30afc67a4bbf09431aff2ad289ff

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela Associação Prudentina de Educação e Cultura - APEC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que se faz essencial em minha vida e sem ele nada disso seria capaz. Aos meus pais, minhas filhas e toda minha família, que com muito amor e carinho me incentivaram, apoiaram e tornaram possível este momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele que está sempre à frente dos meus caminhos agradeço pela força e amparo nos momentos difíceis, por iluminar e abençoar meus caminhos. Aos meus pais, pelo apoio, força e confiança que sempre depositaram em mim. As minhas filhas por entenderem a ausência em diversos momentos dessa jornada e entenderem que a educação pode mudar a humanidade. Aos meus amigos e familiares, que acreditaram na minha capacidade e nunca deixaram de expressar palavras de carinho e incentivo. Aos amigos que fiz na medicina veterinária. Agradeço à minha orientadora, a Profa. Dra. Sílvia Andrade que mesmo no momento mais delicado de sua vida acreditou, apoiou e assumiu a minha orientação no meio da caminhada me direcionando e fazendo acreditar que os sonhos são possíveis, a Profa. Dra. Renata Cassu por ser meu alicerce e minha inspiração acadêmica desde 2013, me incentivando e acreditando que cada pesquisa realizada seria um potencial a ser mostrada no 'Fantástico', além de nunca ter soltado a minha mão, a Profa. Dra. Glaucia Kanashiro que sempre confiou em meu trabalho, além de me apoiar e compreender todas as minhas 'aventuras acadêmicas', e, a todos os colegas que fiz no decorrer dessa pesquisa em especial Dênis e Débora que compartilharam a história de cada paciente atendido, pelos momentos de descontração, pela troca de conhecimento, ajuda e por fazerem parte de todo esse processo. A Fapesp e CAPES pelo apoio financeiro e sempre acreditarem na ciência. Não menos importante agradeço ao Prof. Dr. Michelle Barletta e a Profa. Rachel Reed, pela oportunidade de expandir o conhecimento na Universidade da Geórgia, tenham certeza que cada minuto foi muito bem aproveitado.

E por fim agradeço aos proprietários e aos animais que participaram da pesquisa.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de apoio à pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP com o Processo: 2023/07815-5 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

“Entre dúvidas e descobertas, aprendi que a persistência
transforma sonhos em conquistas”. (*Anônimo*)

RESUMO

Avaliação in vitro e in vivo do potencial anestésico da neosaxitoxina em bloqueios perineurais

A neosaxitoxina (NeoSTX) é uma potente neurotoxina com propriedades anestésicas locais de longa duração. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da NeoSTX em dois modelos experimentais distintos: um estudo in vitro utilizando preparação nervo frênico-diafragma de camundongo e um estudo clínico avaliando o bloqueio peribulbar em cães. No primeiro estudo, foram utilizados oito camundongos machos da linhagem Unib:SW, que foram eutanasiados com isoflurano seguido de exsanguinação. Foram isolados os hemi-diafragmas e respectivos nervos frênicos, que foram montados em sistema miográfico contendo solução Tyrode mantida a 37°C e aerada com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂). As preparações foram tensionadas a 1 g/cm² e estimuladas com pulsos supramaximais (0,1 Hz; 0,2 ms). Após estabilização das respostas contráteis, foram aplicadas concentrações crescentes de NeoSTX (32 nM, 100 nM, 320 nM, 1 µM e 3,2 µM), sendo as respostas registradas por transdutor isométrico acoplado ao sistema LabScribe4. No segundo estudo, foram avaliados 22 cães distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo NeoSTX (G-NeoSTX, n=11), que recebeu 3,5 µg de NeoSTX, e Grupo Bupivacaína (G-Bupi, n=11), que recebeu bupivacaína 0,5% (0,2 mL/kg). Todos os animais foram pré-medicados com dexmedetomidina (2 µg/kg IM) e metadona (0,3 mg/kg IM), induzidos com propofol (dose-efeito IV) e mantidos com isoflurano/O₂. O bloqueio peribulbar foi realizado imediatamente após a intubação. Foram avaliados parâmetros cardiorrespiratórios (frequência cardíaca, frequência respiratória, SpO₂, ETCO₂ e pressão arterial média) e concentração expirada de isoflurano (ETiso) durante o procedimento. A dor foi avaliada utilizando escalas descritivas numéricas (0-4) antes da medicação (basal), 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após extubação. Quando necessário, foi administrada metadona (0,3 mg/kg IM) como analgesia de resgate. Os resultados demonstraram que no estudo in vitro, a NeoSTX na concentração de 3,2 µM promoveu bloqueio neuromuscular completo em 120 minutos, com tempo para 50% de bloqueio de 8,8 ± 1,5 minutos e para 90% de bloqueio de 12,9 ± 2,8 minutos. No estudo clínico, o G-NeoSTX apresentou tempo de analgesia significativamente maior (956 ± 202 minutos) comparado ao G-

Bupi (331 ± 59 minutos; $p=0,001$), além de menores valores de ETiso ($p=0,0006-0,04$) e tempo de recuperação mais curto ($p<0,05$), sem diferenças significativas nos parâmetros cardiorrespiratórios entre os grupos. Conclui-se que a NeoSTX demonstrou efeito bloqueador neuromuscular dose-dependente in vitro e proporcionou analgesia mais prolongada in vivo quando comparada à bupivacaína, representando uma alternativa promissora para anestesia locorregional.

Palavras-chave: analgesia, anestésicos locais, canina, úlcera de córnea, oftalmologia.

ABSTRACT

In vitro and in vivo evaluation of the anesthetic potential of neosaxitoxin in perineural blocks

Neosaxitoxin (NeoSTX) is a potent neurotoxin with long-lasting local anesthetic properties. This study aimed to evaluate the effects of NeoSTX in two distinct experimental models: an in vitro study using a mouse phrenic nerve-diaphragm preparation and a clinical study assessing peribulbar block in dogs. In the first study, eight male Unib:SW mice were euthanized with isoflurane followed by exsanguination. Hemi-diaphragms and their respective phrenic nerves were isolated and mounted in a myographic system containing Tyrode's solution maintained at 37°C and aerated with carbogen (95% O₂ + 5% CO₂). The preparations were tensioned at 1 g/cm² and stimulated with supramaximal pulses (0.1 Hz; 0.2 ms). After stabilization of contractile responses, increasing concentrations of NeoSTX (32 nM, 100 nM, 320 nM, 1 µM, and 3.2 µM) were applied, with responses recorded by an isometric transducer coupled to the LabScribe4 system. In the second study, 22 dogs were randomly allocated into two groups: NeoSTX Group (G-NeoSTX, n=11), receiving 3.5 µg of NeoSTX, and Bupivacaine Group (G-Bupi, n=11), receiving 0.5% bupivacaine (0.2 mL/kg). All animals were premedicated with dexmedetomidine (2 µg/kg IM) and methadone (0.3 mg/kg IM), induced with propofol (effect-dose IV), and maintained with isoflurane/O₂. The peribulbar block was performed immediately after intubation. Cardiorespiratory parameters (heart rate, respiratory rate, SpO₂, ETCO₂, and mean arterial pressure) and end-tidal isoflurane concentration (ETiso) were monitored during the procedure. Pain was assessed using numerical descriptive scales (0-4) before medication (baseline) and at 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 hours post-extubation. Rescue analgesia (methadone 0.3 mg/kg IM) was administered when necessary. Results showed that in the in vitro study, NeoSTX at 3.2 µM concentration induced complete neuromuscular blockade within 120 minutes, with times to 50% and 90% blockade of 8.8 ± 1.5 minutes and 12.9 ± 2.8 minutes, respectively. In the clinical study, G-NeoSTX exhibited significantly longer analgesia duration (956 ± 202 minutes) compared to G-Bupi (331 ± 59 minutes; p=0.001), lower ETiso values (p=0.0006-0.04), and shorter recovery time (p<0.05), with no significant differences in cardiorespiratory parameters between groups. In conclusion, NeoSTX

demonstrated dose-dependent neuromuscular blockade in vitro and provided longer-lasting analgesia in vivo compared to bupivacaine, representing a promising alternative for locoregional anesthesia.

Keywords: analgesia, local anesthetics, locoregional block, canine, corneal ulcer, ophthalmology.

LISTA DE SIGLAS (artigo 1 e artigo 2)

$\mu\text{g/kg}$	Microgramas por quilo
μg	Micrograma
μM	Micromolar
ALs	Anestésicos locais
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
EDN	Escala Descritiva Numérica
ETCO_2	Concentração final expirada de dióxido de carbono
ETiso	Concentração final expirada de Isoflurano
FC	Frequência Cardíaca
g/mm^2	Gramas por milímetro quadrado
G-Bupi	Grupo com bupivacaína
G-NeoSTX	Grupo com neosaxitoxina
g/cm	Gramas por centímetro
Hz	Hertz
IV	Intravenoso
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kg
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH_2PO_4	Fosfato Monossódico
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
Navs	Canais de sódio voltagem-dependentes
NeoSTX	Neosaxitoxina
nM	Nanomolar
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
SC	Sensibilidade Córnea
SpO_2	Saturação de oxigênio na hemoglobina
T	Temperatura
UNOESTE	Universidade do Oeste Paulista

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO 1	13
2	ARTIGO CIENTÍFICO 2	32
	ANEXO 1 - ESCALA DE DOR MODIFICADA DA UNIVERSIDADE DE MELBOURNE PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE BLEFAROESPASMO..	61
	ANEXO 2 - ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DOR OFTALMOLÓGICA.....	62
	ANEXO 3 - ESCALA DE SEDAÇÃO PARA CÃES (FORMA ABREVIADA).....	63
	ANEXO 4 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO VETERINARY ANESTHESIA AND ANALGESIA.....	64
	ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO LABORATORY ANIMALS...	73
	ANEXO 6 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA).....	81

1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Determinação do efeito da neosaxitoxina na neurotransmissão motora do nervo frênico-diafragma de camundongo

Matheus R Ribeiro^a, Renata N Cassu^b, Denis R Gomes^a, Luana F Guldoni^c, Juliana G Pessoni^c Rafael S Floriano^d, Silvia M F Andrade^d

^aDiscente do curso de Pós-graduação em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista.

^bDocente do curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu

^cDiscente de Biomedicina – Universidade do Oeste Paulista.

^dDocente do curso de Pós-graduação em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista

Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Western São Paulo, Brazil

Correspondence:

Matheus R Ribeiro, Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Western São Paulo, Brazil

E-mail: matheusribeiro@unoeste.br

O presente estudo foi realizado com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP com o processo Processo: 2023/07815-5 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001

28 **Resumo**

29 **Objetivo:** Objetivou-se avaliar *in vitro* a curva dose-resposta da neosaxitoxina em nervo
30 frênico de camundongos.

31 **Animais:** Oito camundongos machos da linhagem Unib:SW

32 **Material e Método:** Os animais foram eutanasiados com isoflurano e submetidos à
33 exsanguinação. Foram isolados os hemi-diafragmas e respectivos nervos frênicos, e as
34 preparações montadas em sistema miográfico com solução Tyrode a 37 °C, sob aeração com
35 carbogênio. As hemipreparações foram tensionadas a 1 g/cm e estimuladas com pulsos
36 supramaximais (0,1 Hz; 0,2 ms), sendo registradas por transdutores isométricos e sistema
37 LabScribe4. Após estabilização das respostas contráteis, foram aplicadas concentrações
38 crescentes de NeoSTX (32 nM a 3,2 µM).

39 **Resultados:** O protocolo de cinética mostrou o potencial bloqueador da NeoSTX a partir de
40 32 nM, permitindo-se a estabilização das respostas contráteis por aproximadamente 10
41 minutos antes de aumentar proporcionalmente a concentração da toxina na cuba de registro. O
42 bloqueio neuromuscular completo foi alcançado em 120 minutos, quando a concentração de
43 NeoSTX atingiu 3.2 µM na cuba de registro. Nessa concentração (3.2 µM), o tempo
44 necessário para detecção de 50% e 90% de bloqueio foi $8,8 \pm 1,5$ e $12,9 \pm 2,8$ minutos,
45 respectivamente.

46 **Conclusão:** Os achados deste estudo demonstram que a concentração de 3,2 µM de NeoSTX
47 promove bloqueio completo da neurotransmissão motora do nervo frênico-diafragma de
48 camundongo de forma eficaz e reversível.

49

50 Palavras-chave: saxitoxina, analgesia, anestésicos locais, dose.

51

52

53 INTRODUÇÃO

54 A duração da dor pós-operatória decorrente de muitas intervenções cirúrgicas
55 geralmente persiste por 5 a 7 dias (Joshi et al. 2008, Cooper et al. 2016, Smith et al. 2021).
56 Não raramente, o manejo inadequado da dor pode causar alterações fisiológicas como
57 taquicardia, hipertensão, hiperglicemia entre outros (Glare et al. 2019). Os opioides costumam
58 ser o esteio do manejo da dor (Rosenblum et al. 2008). Os opioides têm muitos efeitos
59 colaterais, incluindo náuseas, prurido, retenção urinária e constipação (Pathan, Williams
60 2012). Com isso a anestesia local se torna uma grande aliada para a prevenção da dor. A
61 anestesia local consiste em um bloqueio nervoso reversível, obtido por meio da injeção de
62 agentes anestésicos próximos ao nervo-alvo ou por infiltração nas terminações sensoriais
63 periféricas, ocupando canais de sódio suficientes dentro de um axônio para interromper a
64 atividade, interrompendo a despolarização e, assim, impedindo a propagação do potencial de
65 ação e a comunicação neuronal (Flink, 1989). Do ponto de vista clínico e científico, há
66 grande interesse em desenvolver estratégias que permitam alcançar uma duração adequada do
67 bloqueio, compatível com o tempo esperado da dor, utilizando-se uma única administração do
68 anestésico local (Kohane et al. 2003).

69 Entretanto, esse objetivo esbarra em alguns desafios como a duração limitada do efeito
70 anestésico e o risco de toxicidade sistêmica (Kohane et al. 2000; Kohane et al. 2001). Os
71 anestésicos locais clássicos, pertencentes às classes dos aminoésteres e aminoamidas,
72 geralmente promovem bloqueios que duram apenas algumas horas e apresentam, por
73 natureza, potencial miotóxico (Lambert et al. 1994, Drasner, 2002, Padera et al. 2008),
74 especialmente quando sua liberação é prolongada por tecnologias de sistemas de liberação
75 controlada (Butterworth, 2010).

76 Além disso, uma vez absorvidos sistemicamente após a administração local, esses
77 fármacos podem atingir concentrações plasmáticas que desencadeiam efeitos adversos graves,

como disfunção cardiovascular e manifestações neurológicas, incluindo convulsões (Kohane et al. 2001).

Entretanto, esses anestésicos possuem tempo de ação e doses determinadas bem esclarecidas. A bupivacaína por exemplo é um dos mais utilizados na medicina veterinária (Zibura et al. 2020, Chow et al. 2015, Shilo-Benjamini et al. 2019, Shilo-Benjamini et al. 2014), devido ao longo bloqueio sensitivo residual, que pode perdurar por volta de 8 horas, contribuindo para a redução da dor e da necessidade de suplementação analgésica pós-operatória (Myrna et al. 2010). Contudo, em alguns casos que se observa a exposição das terminações nervosas, a dor pode perdurar por vários dias, sendo necessário um período mais prolongado de analgesia (Stiles et al. 2023).

A neosaxitoxina (NeoSTX) tem se destacado como uma alternativa promissora no campo da anestesia locorregional e no controle da dor, principalmente devido ao seu prolongado efeito analgésico e mecanismo de ação distinto em comparação aos anestésicos locais tradicionais (Kaye et al., 2022). Pertence à família das saxotoxinas, neurotoxinas originalmente identificadas em moluscos contaminados, conhecidas por causar paralisia em organismos marinhos (Cusick & Sayler, 2013). Assim como os anestésicos locais convencionais, a NeoSTX atua bloqueando os canais de sódio dependentes de voltagem (Navs), porém com diferenças importantes em sua farmacodinâmica (Alonso et al., 2016). Enquanto os anestésicos locais precisam atravessar a membrana celular para inibir completamente os Navs, impedindo a despolarização neuronal (Alonso et al., 2016; Fink, 1989), a NeoSTX se liga especificamente à porção extracelular desses canais, bloqueando seletivamente a transmissão do impulso nervoso e inibindo a condução das fibras sensitivas na região de aplicação (Kohane et al., 2000; Caterrall et al., 1979).

Dentre as nove isoformas conhecidas de canais Nav (Nav1.1 a Nav1.9), a NeoSTX apresenta maior afinidade pelas isoformas Nav1.2 e Nav1.6, predominantes em neurônios

periféricos e nos nódulos de Ranvier (Goldin et al., 2000). Em concentrações mais elevadas, também age sobre a isoforma Nav1.7, expressa principalmente em neurônios sensitivos periféricos envolvidos na nocicepção inflamatória (Alonso et al., 2016). Por outro lado, demonstra baixa afinidade pelas isoformas Nav1.5, Nav1.8 e Nav1.9, presentes no tecido cardíaco e nos gânglios da raiz dorsal, o que sugere um perfil de segurança mais favorável em comparação aos anestésicos locais tradicionais, com menor risco de toxicidade cardiovascular e neurológica (Caterrall et al., 1979; Zimmer, 2010).

Apesar do seu potencial, ainda são escassos os estudos clínicos que estabelecem protocolos posológicos precisos para a NeoSTX. Em humanos, a administração subcutânea de NeoSTX (50 µg) mostrou-se eficaz na dessensibilização tecidual, elevando os limiares de percepção dolorosa ao calor e ao frio por até 3 e 24 horas, respectivamente, sem relatos de efeitos adversos significativos (Rodriguez-Navarro et al., 2007). Em suínos submetidos à orquiectomia, a injeção intratesticular de NeoSTX (0,1 µg) proporcionou melhor controle da dor nas primeiras horas pós-operatórias, além de reduzir o edema e o eritema no local da incisão em comparação à lidocaína (20 mg) (Valenzuela et al., 2019).

A NeoSTX também tem sido investigada no manejo da dor crônica. Em equinos com osteoartrite, a administração subcutânea periarticular de NeoSTX (300 µg) promoveu alívio da dor por até 25 dias, associado à diminuição de marcadores inflamatórios no líquido sinovial (Montero et al., 2021). Da mesma forma, em pacientes humanos com cistite intersticial, a instilação intravesical de NeoSTX (80 µg) resultou em analgesia efetiva por 90 dias, sem eventos adversos relevantes (Manríquez et al., 2015). Esses achados reforçam o potencial da NeoSTX como uma opção terapêutica inovadora, especialmente em situações que demandam analgesia prolongada ou quando o uso repetido de anestésicos locais convencionais é inviável.

Sendo assim a dose ideal da NeoSTX ainda não está completamente estabelecida, sendo demonstrada uma intensa variação na dose administrada nas diferentes espécies estudadas. Contudo, alguns estudos demonstraram que a intensidade e a duração do bloqueio determinadas pela NeoSTX são dose-dependentes (Templin et al. 2015, Lobo et al. 2015, Wylie et al. 2012). Em ratos, a injeção perineural de NeoSTX no nervo ciático com doses inferiores a 3 µg/kg determinou bloqueio sensitivo incompleto e de curta duração, sugerindo a necessidade de doses maiores para otimizar o efeito antinociceptivo. Paralelamente, foi demonstrado neste estudo que a dose letal da NeoSTX é de 4,5 µg/kg (Templin et al. 2015).

Em vista dos resultados supracitados, a utilização da NeoSTX representa uma alternativa aos ALs, visto a possibilidade de prolongar o efeito antinociceptivo, favorecendo o controle da dor pós-operatória, com consequente redução na necessidade de analgesia suplementar. Até a data vigente, não há dados na literatura com relação à determinação da concentração da NeoSTX em bloqueios perineurais de pequenos animais.

Objetivou-se avaliar *in vitro* a curva dose-resposta da NeoSTX em nervo frênico de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo n°8242/2023) e conduzido de acordo com as diretrizes de experimentação do Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments (Arrive) guidelines (<https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines>).

Foram utilizados 8 camundongos machos de linhagem Unib:SW, provenientes do biotério da Universidade de Campinas (Unicamp), com 45 dias, com aproximadamente 20 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C), com ciclo claro/escuro

(12/12 horas diárias), no Laboratório de Toxinologia e estudo cardiovasculares da Universidade do Oeste Paulista, e tiveram um período de adaptação de 60 dias. Foram distribuídos em caixas comuns de polipropileno medindo 41x34x16, com quatro animais por caixa, alimentados com ração própria para ratos (Purina®) e água à vontade. Os animais foram eutanasiados com isoflurano (atmosfera saturada) (Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP) (Figura 1) e em seguida exsanguinados (corte das artérias carótidas). A dissecação consistiu em isolar os hemi-diafragmas e nervos frênicos correspondentes (Figura 2). As preparações foram montadas na unidade miográfica multifuncional (Ugo Basile S.R.L., Varese, Italy) em cubas de 5 mL contendo solução Tyrode (composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1) sob aeração constante por carbogênio, sendo realizados os ensaios em banho a 37°C. Cada hemidiafragma isolado foi tensionado a 1 g/cm por transdutores isométricos DY1 (Figura 3) e submetido a estímulos supramaximais indiretos (0,1 Hz; 0,2 ms), através de eletrodos bipolares posicionados sobre seu respectivo nervo-frênico e conectados a um estimulador. As preparações foram estimuladas por 10 minutos, para estabilização das respostas contráteis antes dos protocolos experimentais. Após a adição de diferentes concentrações de NeoSTX (32 nM, 95 nM, 317 nM, 952 nM e 3.2 µM), as respostas contráteis foram monitoradas por 120 minutos ou até a ocorrência de bloqueio completo; a menor dose que produziu bloqueio completo foi conflitada com a concentração mais efetiva de NeoSTX observada nos estudos clínicos. As respostas contráteis foram registradas em software LabScribe4 por meio de transdutores isométricos DY1 acoplados ao sistema digitalizador de sinais compostos por um New DataCapsule-Evo e um Multiplexing Pulse Booster (Ugo Basile).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos foram expressos como a média $\pm$ D.P.M., com as comparações estatísticas sendo feitas usando o teste t de Student para comparações com o basal. O valor de

p < 0.05 indicou significância. Todas as análises de dados foram feitas usando o software GraphPad Prism v.4.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

O protocolo de cinética mostrou o potencial bloqueador da NeoSTX a partir de 32 nM, permitindo-se a estabilização das respostas contráteis por aproximadamente 10 minutos antes de aumentar proporcionalmente a concentração da toxina na cuba de registro. O bloqueio neuromuscular completo foi alcançado em 120 minutos, quando a concentração de NeoSTX atingiu 3.2 µM na cuba de registro (Figura 3). Nessa concentração (3.2 µM), o tempo necessário para detecção de 50% e 90% de bloqueio foi $8,8 \pm 1,5$ e $12,9 \pm 2,8$ minutos, respectivamente (Figura 4).

DISCUSSÃO

O interesse científico na busca por novos fármacos para o tratamento da dor gerou na última década o aumento de estudos com fármacos derivados de toxinas marinhas como o NeoSTX. Os resultados da experimentação *in vivo* demonstraram que a NeoSTX reduziu a neurotransmissão motora com concentração mínima de 317 nM, contudo bloqueio neuromuscular completo só foi alcançado com a concentração de 3.2 µM, corroborando os achados de Templin et al. (2015), que relataram a necessidade de concentrações de NeoSTX superiores a 3 µM para obtenção de bloqueio efetivo em ratos, além de produzir um bloqueio de longa duração, com obtenção de reversão parcial do bloqueio, somente após consecutivas lavagens com solução Tyrode. Os resultados confirmam a potência bloqueadora da NeoSTX em níveis micromolares, concordando com Valenzuela et al. (2019), que demonstraram que a NeoSTX promove anestesia local eficaz em leitões, sem provocar os efeitos adversos. Embora esse estudo tenha avaliado modelo animal diferente, os mecanismos envolvidos são compatíveis com os resultados, especialmente quanto à afinidade da toxina pelos canais de

sódio dependentes de voltagem, responsáveis pela propagação do impulso nervoso. O bloqueio da atividade simpática ovariana em ratas promovido pela NeoSTX demonstrada no estudo de Del Campo et al. (2020), restabelecendo a ciclicidade estral e a morfologia ovariana normal, contrasta com nossos resultados da eficácia da NeoSTX que está associada à sua capacidade de bloquear os canais de sódio neuronais de forma sustentada, o que leva à interrupção da transmissão nervosa, assim como os achados de Riquelme et al. (2018) em modelo equino de dor óssea sustentando a hipótese de que a NeoSTX promove um bloqueio neurossensorial prolongado. Esse bloqueio prolongado pode estar associado ao bloqueio seletivo de alguns Nav sendo mais específico do Nav 1.2 (Butterworth 2010). Essa diferença farmacodinâmica da NeoSTX em relação aos anestésicos locais clássicos explica o seu efeito duradouro por mais de 24 horas em animais e voluntários humanos (Rodriguez-Navarro et al. 2007, Rodriguez-Navarro et al. 2009). O bloqueio neuromuscular completo obtido após 120 minutos de exposição à concentração de 3.2 μ M reforça a ideia de que a ação da NeoSTX é duradoura e dependente da dose e do tempo de exposição. A concentração encontrada proporcionando o bloqueio total em nossos estudos é inferior a dose tóxica relatada por Zepeda et al. (2014) que demonstraram a toxicidade em diferentes vias de administração sendo 11,4 μ g/kg, 12,41 μ g/kg, 30,35 μ g/kg, 6,06 μ g/kg pelas vias intramuscular, subcutânea, intraperitoneal e intravenosa respectivamente.

O tempo relativamente curto para atingir 50% e 90% de bloqueio neuromuscular (8,8 e 12,9 minutos, respectivamente) após atingir a concentração efetiva, reforça a latência da NeoSTX, mesmo considerando a natureza hidrofílica e a taxa de difusão controlada da molécula, como já descrito por Alonso et al. (2016). Além disso, acredita-se que a necessidade de múltiplas lavagens para reverter o bloqueio observadas nesse estudo possa evidenciar a alta afinidade da NeoSTX pelos sítios de ligação nos canais de sódio caracterizando assim a sua ação prolongada. Esses resultados, portanto, sustentam o uso

potencial da NeoSTX como anestésico local em contextos clínicos e experimentais que
exijam inibição prolongada da condução nervosa, determinando a concentração de 3.2 μ M
como eficaz. Estudos futuros poderão explorar a reversibilidade do bloqueio de maneira mais
detalhada, além de investigar o perfil farmacocinético em diferentes tecidos e condições
fisiológicas.

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo demonstram que a concentração de 3,2 μ M de NeoSTX
promove bloqueio completo da neurotransmissão motora do nervo frênico-diafragma de
camundongo de forma eficaz e reversível.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não têm conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- Alonso E, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. Evaluation of toxicity equivalent factors of
paralytic shellfish poisoning toxins in seven human sodium channels types by an
automated high throughput electrophysiology system. *Arch Toxicol*. 90:479-488, 2016.
- Butterworth JFt: Models and mechanisms of local anesthetic cardiac toxicity: A review.
Reg Anesth Pain Med 2010; 35:167–76
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of
voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26:13-25, 2000.
- Catterall WA, Morrow CS, Hartshorne RP: Neurotoxin binding to receptor sites associated
with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent-solubilized brain
membranes. *J Biol Chem* 254:11379–11387, 1979.
- Cooper SA, Desjardins PJ, Turk DC, Dworkin RH, Katz NP, Kehlet H, Ballantyne JC,
Burke LB, Carragee E, Cowan P, Croll S, Dionne RA, Farrar JT, Gilron I, Gordon DB,

- Iyengar S, Jay GW, Kalso EA, Kerns RD, McDermott MP, Raja SN, Rappaport BA, Rauschkolb C, Royal MA, Segerdahl M, Stauffer JW, Todd KH, Vanhove GF, Wallace MS, West C, White RE, Wu C, Research design considerations for single-dose analgesic clinical trials in acute pain: IMMPACT recommendations, *Pain* 157(2) (2016) 288–301.
- Cusick KD, Sayler GS. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar Drugs*. 11:991-1018, 2013.
- Del Campo, M. et al. In vivo blockade of ovarian sympathetic activity by Neosaxitoxin prevents polycystic ovary in rats. *Journal of Endocrinology*, v. 244, n. 3, p. 523–533, 2020.
- Drasner K: Local anesthetic neurotoxicity: Clinical injury and strategies that may minimize risk. *Reg Anesth Pain Med* 2002; 27:576–80
- Fink BR. The long and the short of conduction block. *Anesth Analg*. 68: 553-555, 1989.
- Glare P, Aubrey KR, Myles PS, Transition from acute to chronic pain after surgery, *Lancet* (London, England) 393(10180) (2019) 1537–1546.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 28:365-368, 2000.
- Joshi GP, Bonnet F, Shah R, Wilkinson RC, Camu F, Fischer B, Neugebauer EA, Rawal N, Schug SA, Simanski C, Kehlet H, A systematic review of randomized trials evaluating regional techniques for postthoracotomy analgesia, *Anesth Analg* 107(3) (2008) 1026–40.

- 276 Kaye AD, Edinoff AN, Yan JY, Kaye AJ, Alvarado MA, Pham AD, Chami AA, Shah RJ,
 277 Dixon BM, Shafeinia A, Cornett EM, Fox C. Novel local anesthetics in clinical
 278 practice: pharmacologic considerations and potential roles for the future. *Anesth Pain*
 279 *Med.*12: e123112, 2022.
- 280 Kohane DS, Berde CB, Strichartz G, Langer RS, Local anesthetic formulations, Google
 281 Patents, 2001.
- 282 Kohane DS, Lu NT, Gökgöl-Kline AC, Shubina M, Kuang Y, Hall S, Strichartz GR, Berde
 283 CB. The local anesthetic properties and toxicity of saxitonin homologues for rat sciatic
 284 nerve block in vivo. *Reg Anesth Pain Med.* 25:52-59, 2000.
- 285 Kohane DS, Smith SE, Louis DN, Colombo G, Ghoroghchian P, Hunfeld NGM, Berde
 286 CB, Langer R, Prolonged duration local anesthesia from tetrodotoxin-enhanced local
 287 anesthetic microspheres, *Pain* 104(1) (2003) 415–421.
- 288 Lambert LA, Lambert DH, Strichartz GR: Irreversible conduction block in isolated nerve
 289 by high concentrations of local anesthetics. *ANESTHESIOLOGY* 1994; 80:1082–93
- 290 Lobo K, Donado C, Cornelissen L, Kim J, Ortiz R, Peake RW, Kellogg M, Alexander ME,
 291 Zurakowski D, Kurgansky KE, Peyton J, Bilge A, Boretsky K, McCann ME, Berde CB,
 292 Cravero J. A Phase 1, Dose-escalation, double-blind, block-randomized, controlled trial
 293 of safety and efficacy of neosaxitoxin alone and in combination with 0.2% bupivacaine,
 294 with and without epinephrine, for cutaneous anesthesia. *Anesthesiology.*123:873-885,
 295 2015.
- 296 Manríquez V, Castro Caperan D, Guzmán R, Naser M, Iglesia V, Lagos N. First evidence
 297 of neosaxitoxin as a long-acting pain blocker in bladder pain syndrome. *Int Urogynecol*
 298 *J.* 26:853-858, 2015.

- 299 Montero C, Riquelme G, Del Campo M, Lagos N. Neosaxitoxin, a paralytic shellfish
300 poison phycotoxin, blocks pain and inflammation in equine osteoarthritis.
301 *Toxicon*.204:5-8, 2021.
- 302 Myrna KE, Bentley E, Smith LJ. Effectiveness of injection of local anesthetic into the
303 retrobulbar space for postoperative analgesia following eye enucleation in dogs. *J Am*
304 *Vet Med Assoc*. 237:174-177, 2010.
- 305 Padera R, Bellas E, Tse JY, Hao D, Kohane DS: Local myotoxicity from sustained release
306 of bupivacaine from microparticles. *ANESTHESIOLOGY* 2008; 108:921–8
- 307 Pathan H, Williams J, Basic opioid pharmacology: an update, *Br J Pain* 6(1) (2012) 11–16.
- 308 Riquelme, G. et al. Neosaxitoxin, a Paralytic Shellfish Poison toxin, effectively manages
309 bucked shins pain, as a local long-acting pain blocker in an equine model. *Toxicon*, v.
310 141, p. 15–17, 2018.
- 311 Rodríguez-Navarro AJ, Berde CB, Wiedmaier G, Mercado A, Garcia C, Iglesias V,
312 Zurakowski D. Comparison of neosaxitoxin versus bupivacaine via port infiltration for
313 postoperative analgesia following laparoscopic cholecystectomy: a randomized, double-
314 blind trial. *Reg Anesth Pain Med*. 36:103-9, 2011.
- 315 Rodríguez-Navarro, A.J.; Lagos, M.; Figueroa, C.; Garcia, C.; Recabal, P.; Silva, P.;
316 Iglesias, V.; Lagos, N. Potentiation of Local Anesthetic activity on Neosaxitoxin with
317 bupivacaine or epinephrine: Development of a long acting pain blocker. *Neurotox. Res*.
318 2009, 16, 408–415.
- 319 Rodríguez-Navarro AJ, Lagos N, Lagos M, Braghetto I, Csendes A, Hamilton J, Figueroa
320 C, Truan D, Garcia C, Rojas A, Iglesias V, Brunet L, Alvarez F. Neosaxitoxin as a local
321 anesthetic: preliminary observations from a first human trial. *Anesthesiology*.106:339-
322 345, 2007.

- Rosenblum A, Marsch LA, Joseph H, Portenoy RK, Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions, *Exp Clin Psychopharmacol* 16(5) (2008) 405–416.
- Shilo-Benjamini Y, Pascoe PJ, Maggs DJ, Hollingsworth SR, Strom AR, Good KL, Thomasy SM, Kass PH, Wisner ER. Retrobulbar vs peribulbar regional anesthesia techniques using bupivacaine in dogs. *Vet Ophthalmol*. 22:183-191, 2019.
- Shilo-Benjamini Y, Pascoe PJ, Maggs DJ, Pypendop BH, Johnson EG, Kass PH, Wisner ER. Comparison of peribulbar and retrobulbar regional anesthesia with bupivacaine in cats. *Am J Vet Res*. 75:1029-1039, 2014.
- Smith CR, Baharloo R, Nickerson P, Wallace M, Zou B, Fillingim RB, Crispin P, Parvataneni H, Gray C, Prieto H, Machuca T, Hughes S, Murad G, Rashidi P, Tighe PJ, Predicting long-term postsurgical pain by examining the evolution of acute pain, *European journal of pain* (London, England) 25(3) (2021) 624–636.
- Stiles J, Honda CN, Krohne SG, Kazacos EA. Effect of topical administration of 1% morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs. *Am J Vet Res*. 64: 813-818, 2023.
- Templin JS, Wylie MC, Kim JD, Kurgansky KE, Gorski G, Kheir J, Zurakowski D, Corfas G, Berde C. Neosaxitoxin in rat sciatic block: improved therapeutic index using combinations with bupivacaine, with and without epinephrine. *Anesthesiology*.123:886-898, 2015.
- Valenzuela C, Torres C, Muñoz V, Simbaina JC, Sánchez A, Bustamante T, Sepúlveda JM, Piron R, Del Campo M, Lagos N. Evaluation of Neosaxitoxin as a local anesthetic during piglet castration: A potential alternative for Lidocaine. *Toxicon*.164:26-30, 2019.
- Zepeda RJ, Candiracci M, Lobos N, Lux S, Miranda HF. Chronic toxicity study of neosaxitoxin in rats. *Mar Drugs*. 2014 Sep 25;12(9):5055-71.

Zibura AE, Posner LP, Ru H, Westermeyer HD. A preoperative bupivacaine retrobulbar block offers superior antinociception compared with an intraoperative splash block in dogs undergoing enucleation. *Vet Ophthalmol.* 23:225-233, 2020.

Zimmer T: Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system. *Mar Drugs* 8:741–762, 2010.

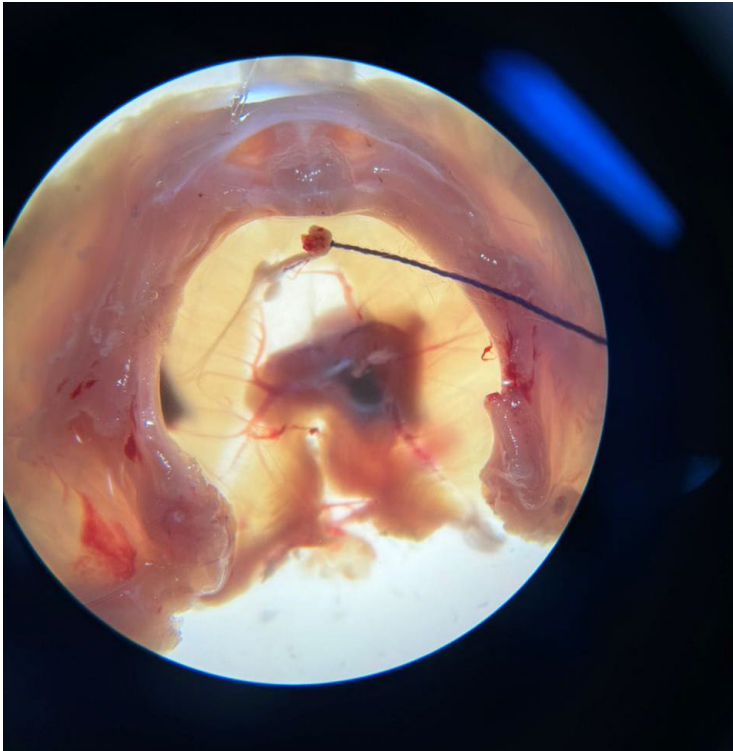
Wylie MC, Johnson VM, Carpino E, Mullen K, Hauser K, Nedder A, Kheir JN, Rodriguez-Navarro AJ, Zurakowski D, Berde CB. Respiratory, neuromuscular, and cardiovascular effects of neosaxitoxin in isoflurane-anesthetized sheep. *Reg Anesth Pain Med.* 37:152-158, 2012.

FIGURAS



Figura 1. Câmara hiperbárica saturada com isoflurano

387



388

389 **Figura 2.** Isolamento dos hemi-diafragmas e nervos frênicos correspondentes.

390

391

392

393

394

395

396

397

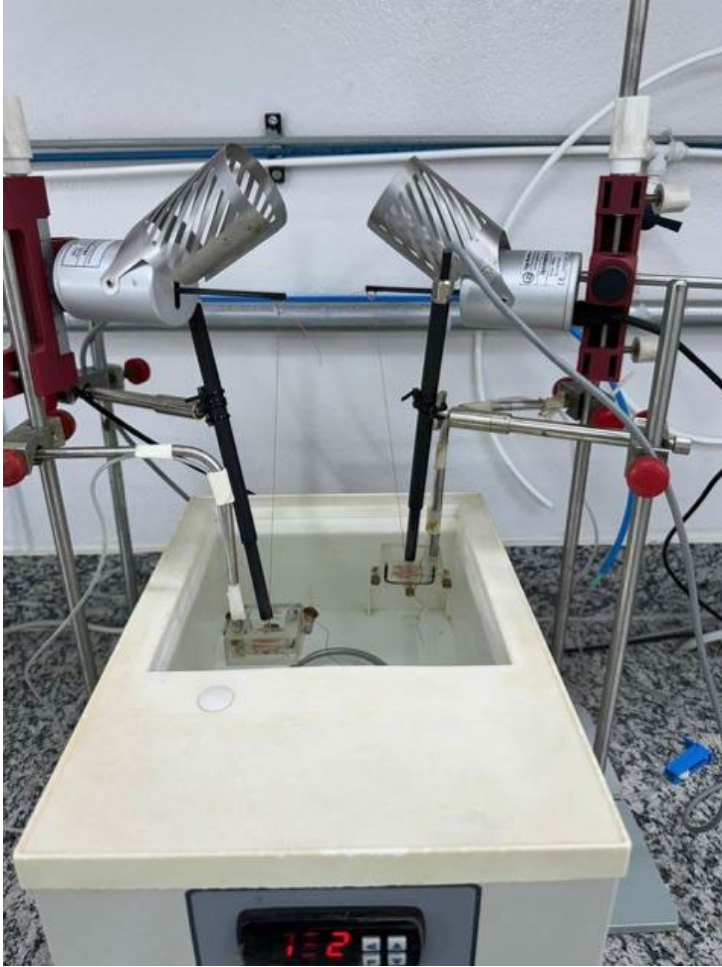


Figura 3. Hemidiafragma isolado tensionado a 1 g/cm por transdutores isométricos DY1 submetido a estímulos supramaximais indiretos (0,1 Hz; 0,2 ms), através de eletrodos bipolares posicionados sobre seu respectivo nervo-frênico e conectados ao estimulador.

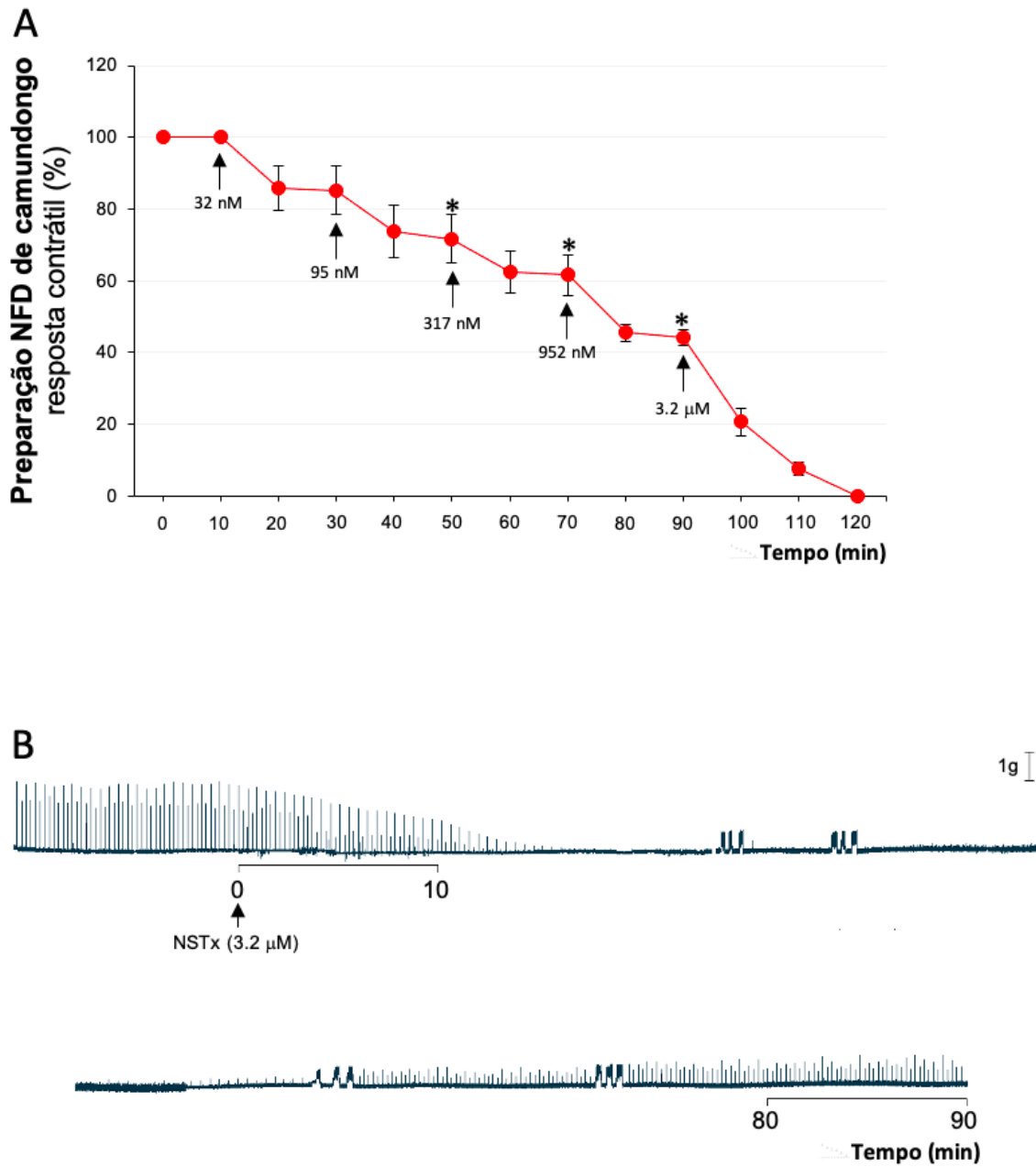


Figura 4. (A) Avaliação cinética do bloqueio neuromuscular induzido por neosaxitoxina em preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo. (B) Registro representativo do efeito direto da neosaxitoxina (3.2 mM) em preparação NFD de camundongo, com parcial reversão após sucessivas lavagens com solução Tyrode.

Na Figura A, os pontos representam a média $\pm$ E.P.M, com (*) indicando diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao valor de amplitude basal (t_0).

2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Bloqueio peribulbar com neosaxitoxina como alternativa à bupivacaína para o controle da dor perioperatória em cães submetidos à ceratoplastia reconstrutiva.

Matheus R Ribeiro^a, Renata N Cassu^b, Denis R Gomes^a, Debora S Alves^a, Bruno K Ariga^a, Rafael S Floriano^c, Silvia M F Andrade^c

^a Universidade do Oeste Paulista, Departamento de Cirurgia e Anestesia Animal, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

^b Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP, Departamento de Cirurgia Animal, Botucatu, São Paulo.

^c Universidade do Oeste Paulista, Departamento de Pós-graduação em Ciência Animal, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência: Matheus R Ribeiro, E-mail: matheusribeiro@unoeste.br

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de apoio à pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP com o processo Processo: 2023/07815-5 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001

Contribuição dos autores: MRR, DRG, DSA, BKA, RSF, SMFA - Desenho do estudo, Coleta de dados, Elaboração do manuscrito; RNC – Desenho do estudo, Coleta de dados, Análise de dados, Elaboração do manuscrito.

Os autores declaram que não houve conflito de interesse.

Resumo

Objetivo: Objetivou-se avaliar o efeito analgésico perioperatório proporcionado pelo bloqueio peribulbar com neosaxitoxina, comparativamente, à bupivacaína.

Design: Estudo clínico, prospectivo, encoberto, randomizado e controlado.

Animais: 22 cães

Material e método: Os animais foram sedados pela associação de dexmedetomidina (2 µg/kg) e metadona (0,3 mg/kg), por via intramuscular (IM), seguindo-se a indução anestésica por via intravenosa com propofol (dose-efeito) e a manutenção com isoflurano/O₂. Imediatamente após a intubação endotraqueal, foi realizado o bloqueio peribulbar com neosaxitoxina (3,5 µg; G-NeoSTX, $n = 11$) ou bupivacaína 0,5% (0,2 ml/kg; G-Bupi, $n = 11$). Durante a anestesia, foram avaliados os parâmetros cardiorrespiratórios e a concentração final expirada de isoflurano (ETiso). A dor e a sedação foram avaliadas utilizando-se escalas descritivas numéricas, antes da medicação pré-anestésica (basal), 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a extubação traqueal. Sensibilidade da córnea e grau de blefaroespasma foram avaliados no basal e em diferentes momentos após a realização do bloqueio peribulbar. Em casos de analgesia insuficiente, metadona (0,3 mg/kg, IM) foi administrada como analgesia de resgate. Os dados foram avaliados com teste t não pareado, análise de variância, teste de Tukey, teste de Fisher, teste de Mann-Whitney e Friedman, com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

Resultados: O tempo de anestesia e de recuperação pós-anestésica foram mais curtos no G-NeoSTX (0,02-0,04). O tempo necessário para a centralização do globo ocular após a realização do bloqueio loco-regional foi superior no grupo G-NeoSTX em relação ao G-Bupi ($24,4 \pm 4$ versus $14,2 \pm 3,6$ minutos; $p < 0.0001$). Os parâmetros cardiorrespiratórios não diferiram entre os tratamentos e nem ao longo do tempo. Valores inferiores de ETsio foram registrados no G-NeoSTX aos 10, 30, 40 e 50 minutos após o bloqueio em relação ao G-Bupi ($p = 0,0006-0,04$). A sensibilidade da córnea, os escores de blefaroespasma, dor e sedação

não diferiram entre os grupos, exceto às 18 e 24 horas, quando valores inferiores de sensibilidade da córnea foram registrados no G-NeoSTX ($p = 0,02$). Essas variáveis não diferiram ao longo do tempo, com exceção dos escores de sedação, que foram superiores na primeira hora após a extubação traqueal em relação aos valores basais ($p < 0,0001$), em ambos os grupos. Analgesia de resgate foi necessária em 36,4% (4/11) dos cães de cada grupo ($p = 1,00$). No G-Bupi a suplementação analgésica foi requerida entre 4 e 6 horas, enquanto no G-NeoSTX entre 12 e 18 horas após a extubação traqueal (Tabela 3). O tempo médio de analgesia foi superior no G-NeoSTX em relação ao G-Bupi (956 ± 202 versus 331 ± 59 minutos; $p = 0,001$).

Conclusão: Com base nos resultados parciais, sugere-se que a NeoSTX pode ser utilizada com sucesso e segurança no bloqueio peribulbar de cães, com a vantagem de proporcionar analgesia mais longa em relação à bupivacaína.

Palavras-chaves: analgesia, anestésicos locais, bloqueio loco-regional, canina, úlcera de córnea, oftalmologia.

Introdução

A ceratite ulcerativa é uma das oftalmopatias mais frequentes na espécie canina, caracterizada pela lesão do epitélio da córnea e exposição do estroma corneal, cujo tratamento pode ser clínico ou cirúrgico, dependendo da gravidade da afecção (Kern, 1990). Em casos de úlceras estromais profundas, com risco de ruptura e perda permanente da visão, há necessidade de intervenção rápida, sendo indicada a correção cirúrgica, principalmente com técnicas de apoio mecânico e que auxiliem a cicatrização da córnea, como tarsorrafia, aplicação de adesivos teciduais, recobrimentos conjuntivais e ceratoplastia reconstrutiva com membranas naturais ou sintéticas (Wilkie; Whittaker, 1997)

A superfície da córnea e o estroma anterior são estruturas ricamente enervadas com fibras sensoriais, predispondo o paciente a dor moderada a intensa no período perioperatório,

que pode ser melhor controlada pela utilização de protocolos multimodais de analgesia (Yang et al, 2018). A inclusão de técnicas locorreional nos protocolos anestésicos para cirurgias oftálmicas é uma das formas mais efetivas de inibir o processo nociceptivo frente ao estímulo cirúrgico, favorecendo a redução do requerimento anestésico e analgésico no período intraoperatório (Park et al, 2010, Ahn et al 2013, Briley et al 2023). Paralelamente, os bloqueios loco-regionais determinam acinesia dos músculos extraoculares, resultando na centralização do globo ocular e midríase, que são efeitos favoráveis para a maioria das cirurgias oftálmicas (Ahn et al. 2013, Shilo-Benjamini, 2019).

As técnicas anestésicas loco-regionais retrobulbar e peribulbar são as mais utilizadas para cirurgias oftálmicas em cães (Briley et al. 2023, Shilo-Benjamini, 2019, Zibura et al. 2020, Chow et al. 2015, Shilo-Benjamini et al. 2019, Shilo-Benjamini et al. 2014). A anestesia peribulbar é uma variação da técnica retrobulbar, sendo possível a utilização de um maior volume de solução anestésica, que pode ser aplicado em dois pontos anatômicos, incluindo o canto súpero-medial e o canto ínfero-lateral da órbita (Shilo-Benjamini, 2019). Apesar das duas técnicas serem indicadas para cirurgias oftálmicas, estudos prévios demonstraram que o bloqueio peribulbar proporciona dessensibilização mais efetiva da córnea e da pele periocular em relação ao bloqueio retrobulbar em cães e gatos (Shilo-Benjamini et al. 2019, Shilo-Benjamini et al. 2014). Entre os anestésicos locais, a bupivacaína é um dos mais utilizados em ambas as técnicas de anestesia oftálmicas loco-regionais (Zibura et al 2020, Chow et al, 2015, Shilo-Benjamini et al, 2019, Shilo-Benjamini et al, 2014), devido ao longo bloqueio sensitivo residual, que pode perdurar por volta de 8 horas, contribuindo para a redução da dor e da necessidade de suplementação analgésica pós-operatória (Myrna et al, 2010). Contudo, em casos de úlcera de córnea, devido à exposição das terminações nervosas pela perda do colágeno, a dor pode perdurar por vários dias após a cirurgia, sendo necessário um período mais prolongado de analgesia para esses pacientes (Stiles et al, 2023).

A aplicação clínica da neosaxitoxina (NeoSTX) tem despertado interesse nas áreas de anestesiologia e analgesia, devido ao seu mecanismo de ação semelhante ao dos anestésicos locais (ALs) convencionais, porém com duração mais prolongada (Kaye et al, 2022). A NeoSTX é uma toxina pertencente à família das saxotoxinas, que foi isolada pela primeira vez em 1977, sendo extraída de moluscos produtores de neurotoxinas com efeito paralisante (Cusick, Sayler, 2013). Assim como os ALs, a NeoSTX determina bloqueio reversível nos canais de sódio voltagem-dependentes (Navs) (Alonso et al, 2016). Contudo, diferente dos ALs que penetram no axônio através da membrana celular e bloqueiam completamente os Navs, impedindo a despolarização do neurônio (Alonso et al, 2016, Fink, 1989), a NeoSTX determina potente bloqueio de alguns Navs na porção extracelular, impedindo a propagação do impulso nervoso, com consequente inibição das fibras neuronais sensitivas na área onde foi injetada (Kohane et al, 2000, Caterrall et al, 1979). Existem pelo menos 9 isoformas dos Navs, denominadas Nav1.1 até Nav1.9 (Goldin et al, 2000). A NeoSTX atua sobretudo nas isoformas Nav1.6, que é uma das mais predominantes nos neurônios periféricos, dendritos e nódulos ranvier. Em concentrações mais elevadas a NeoSTX atua também na isoforma Nav1.7, cuja expressão ocorre predominantemente em neurônios periféricos sensitivos, que estão intimamente relacionados ao processo nociceptivo inflamatório (Alonso et al, 2016). Paralelamente, a NeoSTX possui pouca afinidade pelas isoformas Nav1.5, Nav1.8 e Nav 1.9, que são similares entre si e altamente expressas no coração e nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, implicando em menor risco de toxicidade cardíaca e neurológica em comparação aos ALs (Caterrall et al, 1979, Zimmer, 2010).

Apesar do potencial antinociceptivo da NeoSTX, ainda há poucos estudos publicados com foco no uso dessa substância em bloqueios loco-regionais. Em voluntários humanos, o bloqueio infiltrativo subcutâneo com NeoSTX (50 µg) determinou dessensibilização efetiva, sendo demonstrado aumento nos limiares nociceptivos ao calor e ao frio durante 3 e 24 horas,

respectivamente, além de ausência de efeitos adversos (Rodriguez-Navarro et al, 2007) Em suínos submetidos à orquiectomia, o bloqueio intratesticular com NeoSTX (0,1 µg) resultou em escores inferiores de dor, durante duas horas após a cirurgia, além de menor grau de eritema e edema na ferida cirúrgica 24 horas após a cirurgia em relação ao bloqueio intratesticular com lidocaína (20 mg) (Valenzuela et al, 2019). Existem também relatos clínicos sobre a utilização da NeoSTX para o tratamento da dor crônica. Em equinos portadores de osteoartrite, a injeção subcutânea de NeoSTX (300 µg) diluída em solução salina foi distribuída equitativamente em dois pontos laterais da articulação acometida reduziu os escores de dor durante 25 dias, além de diminuir a concentração de marcadores pró-inflamatórios no líquido sinovial (Montero et al, 2021). Resultados promissores também foram demonstrados em pacientes humanos portadores de dor crônica secundária à cistite intersticial, nos quais a administração intra-vesical de NeoSTX (80 µg) diluída em solução salina 0,9% proporcionou analgesia efetiva durante 90 dias, sem efeitos adversos (Manríquez et al, 2015).

A dose ideal da NeoSTX ainda não está completamente estabelecida, sendo demonstrada uma intensa variação na dose administrada nas diferentes espécies estudadas. Contudo, alguns estudos demonstraram que a intensidade e a duração do bloqueio determinadas pela NeoSTX são dose-dependentes (Templin et al, 2015, Lobo et al, 2015, Wylie et al 2012). Em ratos, a injeção perineural de NeoSTX no nervo ciático com doses inferiores a 3 µg determinou bloqueio sensitivo incompleto e de curta duração, sugerindo a necessidade de doses maiores para otimizar o efeito antinociceptivo. Paralelamente, foi demonstrado neste estudo que a dose letal da NeoSTX é de 4,5 µg/kg (Templin et al, 2015).

Em vista dos resultados supracitados, a utilização da NeoSTX em bloqueios loco-regionais representa uma alternativa aos ALs, visto a possibilidade de prolongar o efeito antinociceptivo, favorecendo o controle da dor pós-operatória, com consequente redução na

necessidade de analgesia suplementar. Até a data vigente, não há dados na literatura com relação à utilização da NeoSTX em bloqueios perineurais de pequenos animais.

Objetivou-se avaliar a eficácia analgésica perioperatória do bloqueio peribulbar com NeoSTX comparativamente à bupivacaína em cães com úlcera de córnea encaminhados para ceratoplastia reconstrutiva, cuja hipótese formulada foi de que a NeoSTX poderia determinar bloqueio sensitivo intraoperatório tão efetivo quanto ao da bupivacaína, porém mais prolongado, aumentando o tempo de analgesia em relação ao G-Bupi.

Material e Método

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº8242/2023) e conduzido de acordo com as diretrizes de experimentação do Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments (Arrive) guidelines (<https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines>).

Em estudo clínico, prospectivo, encoberto, randomizado e controlado, foi investigada a eficácia analgésica perioperatória do bloqueio peribulbar com NeoSTX comparativamente à bupivacaína em cães encaminhados para correção cirúrgica de úlcera de córnea. A inclusão dos animais selecionados para participação na pesquisa foi realizada mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido dos tutores.

Animais

Foram avaliados 22 cães, de diferentes raças, provenientes da rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, encaminhados para realização de

correção cirúrgica de úlceras corneais profundas. O diagnóstico foi realizado com base nos sinais clínicos do paciente e exame oftalmológico com lâmpada de fenda, incluindo teste lacrimal de Schirmer e teste de fluoresceína. Foram incluídos no estudo animais com úlcera de córnea profunda (estromal profunda, descemetocelose e prolapso de íris), cujos exames laboratoriais (hemograma completo, bioquímico renal e hepático) estejam dentro dos limites de referência para a espécie. Critérios de exclusão: afecções no olho contralateral que possam causar dor, infecção de pele no local da punção peribulbar, tratamento com opioides ou anti-inflamatórios dentro das 18 horas que precedem o procedimento cirúrgico, comportamento agressivo. Os animais foram submetidos à restrição alimentar de 8 a 12 horas antes da cirurgia.

Anestesia e instrumentação

Todos os animais foram pré-medicados com dexmedetomidina (2 µg/kg; Dexdomitor, Zoetis, São Paulo, SP) associada à metadona (0,3 mg/kg; Metadon, Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP) pela via intramuscular (IM). Trinta minutos após, foi realizada a cateterização (Insyte, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG) percutânea da veia cefálica, seguindo-se a indução anestésica com propofol (Propovan, Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP), em dose suficiente para obtenção de relaxamento muscular e inibição do reflexo traqueal. Ato contínuo, foi realizada a intubação orotraqueal, seguindo-se a manutenção com isoflurano (Isoforine, Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP), em circuito com re-inalação parcial de gases (Sat 500, Takaoka, São Paulo, SP), pelo qual foi fornecido oxigênio a 100% com fluxo de 100 ml/kg/min, mantido por 10 minutos, com posterior redução para 60 ml/kg/min. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea, sendo instituída a ventilação mecânica, somente se a concentração final expirada

de dióxido de carbono (ETCO₂) exceder 45 mmHg. Para determinação da ETCO₂ e concentração final expirada de isoflurano (ETiso), foi utilizado um analisador de gases infravermelho (Monitor Multi-Parâmetro LifeWindow™ LW9xVet, Digicare Animal Health, Flórida, EUA; Processo FAPESP 2018/13116-0), cuja calibração foi feita com amostra de gás padrão, antes de cada procedimento. A temperatura (T) foi aferida através de um sensor trans-esofágico (Monitor Multi-Parâmetro LifeWindow™ LW9xVet, Digicare Animal Health, Flórida, EUA; Processo FAPESP 2018/13116-0), sendo mantida entre 37,5 e 38,5° C com o auxílio de insuflador de ar aquecido (Sistema de Aquecimento de Ar Automático Veterinário, Warm Air WA-7001, Hefei *Longshore* Tech Co., Ltd., Anhui Province, China; Processo FAPESP 2018/13116-0).

Os cães foram posicionados em decúbito lateral para cateterização percutânea da artéria dorsal podal. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão para mensuração da pressão arterial sistólica, média e diastólica (PAS, PAM e PAD) através de monitor multiparamétrico. O transdutor de pressão foi posicionado na altura do coração (externo) com o valor zero de referência (0 mmHg) ajustado periodicamente de acordo com a pressão ambiente.

Para monitoração da frequência cardíaca (FC) e do ritmo cardíaco foi empregada a derivação II do eletrocardiograma (Monitor Multi-Parâmetro LifeWindow™ LW9xVet, Digicare Animal Health, Flórida, EUA; Processo FAPESP 2018/13116-0). A saturação de oxigênio na hemoglobina (SpO₂) foi monitorada por oxímetro de pulso (Monitor Multi-Parâmetro LifeWindow™ LW9xVet, Digicare Animal Health, Flórida, EUA; Processo FAPESP 2018/13116-0), adaptando-se o sensor infravermelho na língua dos animais.

Durante todo o procedimento, os animais foram mantidos em fluidoterapia com Ringer lactato (5 ml/kg/h), administrada por bomba de infusão peristáltica (UNK-IP-2014 Progetti Medical Equipaments Solutions, Turim, Itália).

Grupos estudados

Os animais foram distribuídos aleatória e equitativamente em dois tratamentos, com auxílio de um programa de randomização (Research Randomizer, <http://www.randomizer.org/>). Imediatamente após a intubação endotraqueal, foi realizada a administração peribulbar de bupivacaína (G-Bupi, $n = 11$) ou NeoSTX (G-NeoSTX, $n = 11$). No G-Bupi foi administrado 0,2 ml/kg de bupivacaína 0,5% (Novabupi, Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP) e no G-NeoSTX foi administrado 3,5 µg de NeoSTX (Cifga, Labtec Blumenau, SC), diluída em solução salina 0,9%, visando a obtenção de volume final de 0,2 ml/kg. O acesso peribulbar foi guiado por ultrassonografia para garantir a deposição correta do medicamento e evitar a punção acidental de nervos ou vasos sanguíneos. O bloqueio peribulbar (Figura 4 A-B) foi realizado mediante dupla punção transconjuntival, com aplicação de metade do volume no terço lateral da margem orbitária inferior e a outra metade no terço medial da margem orbitária superior.¹⁰ O bloqueio foi realizado com agulha hipodérmica 25x5.5, que foi inserida próxima à parede orbitária para evitar a perfuração do bulbo ocular, com o bisel direcionado para o bulbo ocular para reduzir a resistência ao volume injetado.

Procedimento cirúrgico e monitoração perioperatória

As cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, que utilizou uma membrana de biomaterial de plataforma 3D constituídas de nanofibras poliméricas naturais de 1.5 cm de profundidade/16,25 mm de diâmetro (Plastocell, Presidente Prudente, SP) para ceratoplastia reconstrutiva. O tamanho e profundidade da membrana foram escolhidos em função da lesão de córnea. Após preparo cirúrgico da lesão, a membrana foi suturada à córnea com uma sutura absorvível (Vicryl[®] absorvível 9-0 ou 10-0, agulha 5,5 mm ½ círculo).

Os parâmetros cardiorrespiratórios (FC, PAS, PAM, PAD, SpO₂, ETCO₂) e a ETiso foram monitorados continuamente, no entanto foram considerados para análise estatística os seguintes momentos: 10 minutos após o bloqueio peribulbar, com os animais mantidos em ETiso de 1,0%, seguindo-se a mensuração a cada 10 minutos até o término da cirurgia.

Os tempos de anestesia (tempo decorrido entre a administração do propofol e interrupção do isoflurano), de extubação (tempo decorrido entre a interrupção do isoflurano e a presença do reflexo laringo-traqueal), de cirurgia (tempo decorrido entre a incisão da córnea e o último ponto) e de recuperação (período transcorrido entre o término da cirurgia e a manutenção do animal em posição quadrupedal) foram registrados.

Avaliação do requerimento anestésico e analgésico no período intraoperatório

Inicialmente, a ETiso foi mantida em 1,0%. Durante o procedimento anestésico, a ETiso foi ajustada visando a manutenção de plano anestésico cirúrgico, que foi estabelecido em função dos seguintes sinais clínicos: rotação do globo ocular, ausência de reflexo palpebral, ausência de tônus mandibular e PAM entre 60 e 90 mmHg. Em situações de PAM e/ou FC acima de 20% em relação à mensuração anterior de cada parâmetro, a ETiso seria incrementada em 0,2%, até a concentração máxima de 1,8%. Se o aumento da ETiso não fosse suficiente para controlar as alterações cardiovasculares frente ao estímulo cirúrgico,

seria administrado 2,5 µg/kg (IV) de fentanil (Fentanest, Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP).

Avaliações oftálmicas

O grau de blefaroespasma foi avaliado por sistema de escore, através da escala modificada da Universidade de Melbourne (Anexo 1) (Spertus et al, 2020). A sensibilidade da córnea (SC) foi mensurada com o estesiômetro de Cochet-Bonnet (Figura 5) (Luneau Ophtalmologie, Paris, França), que consiste de um monofilamento de nylon de 60 mm de comprimento e 0,12 mm de diâmetro, cujo comprimento foi ajustado de acordo com a resposta do animal (de 5 a 60 mm), determinado uma pressão de 11 a 200 mg/0,0113 mm². O comprimento do filamento é diretamente proporcional à sensibilidade da córnea, de modo que uma córnea mais sensível é induzida a piscar em resposta a um comprimento de filamento maior. O filamento foi aplicado perpendicularmente à superfície corneana, até à detecção de uma discreta deflexão do mesmo. O estímulo foi aplicado cinco vezes consecutivas. Se o animal não piscar em pelo menos três das cinco tentativas, o comprimento do filamento foi diminuído em incrementos de 5 mm e o procedimento foi repetido, até a observação da resposta do paciente frente ao estímulo^{5,31}. O valor da SC foi registrado como o comprimento do filamento (g/mm²) capaz de induzir resposta positiva, em pelo menos três das cinco estimulações. Tais parâmetros foram avaliados no basal, 1, 4, 8, 12 e 24 horas após a extubação endotraqueal. Foram avaliados também, o tempo decorrido (minutos) entre o bloqueio peribulbar e a completa centralização do globo ocular e máximo diâmetro pupilar; tempo decorrido (minutos) entre o bloqueio peribulbar e o início e o término da cirurgia (minutos); tempo decorrido (minutos) entre o bloqueio peribulbar e a administração do primeiro resgate analgésico no período pós-operatório.

Avaliação da analgesia e sedação pós-operatória

Os escores de dor e sedação foram mensurados antes da medicação pré-anestésica (basal), 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 e 24 horas após extubação traqueal. As mensurações foram realizadas de forma encoberta, por um único observador, treinado previamente em estudos clínicos com foco na avaliação de dor pós-operatória em cães.

A dor foi avaliada mediante um sistema de escore descritivo, composto por 6 categoriais, cujas pontuações podem variar de 0-3 ou 0-4 (escore total 0-21 pontos) (Anexo 2) (Smith et al, 2004). Nos animais, cujo somatório total dos escores foi ≥ 9 , ou o somatório de uma das categorias da escala foi ≥ 3 , metadona (0,3 mg/kg, IM) foi administrada como analgesia de resgate. O grau de sedação foi avaliado utilizando-se Escala Descritiva Numérica (EDN), composta de 5 categorias (0-12 pontos) (Anexo 3)(Wagner et al. 2017)

Efeitos adversos

A ocorrência de possíveis efeitos adversos como, náusea, vômito, tremores, convulsões e alterações cardiorrespiratórias foram registradas durante o período perioperatório. Bradicardia e hipotensão foram definidas como $FC < 60$ batimentos/minuto e $PAM < 60$ mmHg, respectivamente, persistindo por mais de 5 minutos consecutivos.

727 **Análise Estatística**

728 Considerando-se uma aumento de 30% no tempo de analgesia pós-operatória no G-
729 NeoSTX (tempo médio de 8 horas) em relação ao G-Bupi (tempo médio de 6 horas), e
730 adotando-se como parâmetros adicionais a proporção entre grupos de 1:1, poder do teste de
731 80% e nível alfa de 5%, estimou-se que seriam necessários no mínimo 11 animais em cada
732 grupo. O desvio padrão foi estimado em 1,7. Os cálculos foram realizados com auxílio do
733 software Biostat 5.3.

734 Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para identificar a
735 sua distribuição. Para comparação dos dados demográficos (peso, idade, tempo de anestesia,
736 tempo cirúrgico, tempo de extubação, tempo de recuperação, tempo de centralização do globo
737 ocular, tempo de analgesia, dose de propofol e média total da Etiso) foi empregado o teste t-
738 não pareado. Os parâmetros vitais avaliados no período intraoperatório e a Etiso foram
739 comparados entre os grupos e ao longo do tempo por análise de variância (ANOVA) com
740 contrastes verificados pelo método de Tukey. Os escores de dor e sedação foram comparados
741 entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney, enquanto o teste de Friedman foi empregado
742 para avaliação ao longo do tempo para um mesmo grupo, com contrastes verificados pelo
743 teste de Dunn. As áreas sob as curvas (AUCs) correspondentes ao escores de dor dos animais
744 que não receberam analgesia de resgate foram calculadas desde o momento basal até 24 horas
745 após a extubação traqueal, utilizando-se o método trapezoidal, com posterior comparação
746 entre os grupos por ANOVA e teste de Tukey. A prevalência de analgesia de resgate e de
747 efeitos adversos foi comparada entre os grupos, utilizando-se o teste exato de Fisher. O nível
748 de significância utilizado em todos os testes foi de 5%.

749

750

RESULTADOS

Dados demográficos, dose de propofol e variáveis perioperatórias

Não houve diferença entre os tratamentos em relação ao peso corpóreo, idade, dose de propofol, tempo de cirurgia e tempo de extubação. O tempo de anestesia e de recuperação pós-anestésica foram mais curtos no G-NeoSTX (0,02-0,04) (Tabela 1). Foram incluídos no estudo cães das raças: Shih Tzu (5), Lhasa Apso (7), Poodle (1), Dachshund (3) e SRD (6) sendo 14 fêmeas e 8 machos.

Monitoração durante a anestesia

O tempo necessário para a centralização do globo ocular após a realização do bloqueio loco-regional foi superior no grupo G-NeoSTX em relação ao G-Bupi ($24,4 \pm 4$ versus $14,2 \pm 3,6$ minutos; $p < 0.0001$). Os parâmetros cardiorrespiratórios não diferiram entre os tratamentos e nem ao longo do tempo. Valores inferiores de ETsio foram registrados no G-NeoSTX aos 10, 30, 40 e 50 minutos após o bloqueio em relação ao G-Bupi ($p = 0,0006-0,04$) (Tabela 2). A Etiso total (entre T0 e T5) foi inferior no G-NeoSTX ($0,77 \pm 0,08\%$) em relação ao G-Bupi ($0,93 \pm 0,10\%$) ($p = 0,001$).

Não foi necessária suplementação analgésica intraoperatória em nenhum dos animais avaliados. Bradicardia foi registrada em 36,3% (4/11) dos cães de cada grupo ($p = 1,00$).

Monitoração Pós-operatória

A sensibilidade da córnea, os escores de blefaroespasma, dor e sedação não diferiram entre os grupos, exceto às 18 e 24 horas após a extubação traqueal, quando valores inferiores de sensibilidade da córnea foram registrados no G-NeoSTX ($p = 0,02$). Essas variáveis não diferiram ao longo do tempo, com exceção dos escores de sedação, que foram superiores na

primeira hora após a extubação traqueal em relação aos valores basais ($p < 0,0001$), em ambos os grupos (Figura 3 A-D). Não houve diferença entre os grupos nas AUCs referentes aos escores de dor (G-Bupi = $121 \pm 6,8$; G-NeoSTX = $103 \pm 8,5$; $p = 0,12$).

Analgesia de resgate foi necessária em 36,4% (4/11) dos cães de cada grupo ($p = 1,00$). No G-Bupi a suplementação analgésica foi requerida entre 4 e 6 horas, enquanto no G-NeoSTX entre 12 e 18 horas após a extubação traqueal (Tabela 3). O tempo médio de analgesia foi superior no G-NeoSTX em relação ao G-Bupi (956 ± 202 *versus* 331 ± 59 minutos; $p = 0,001$).

DISCUSSÃO

A hipótese do atual estudo foi confirmada, sendo demonstrado que o bloqueio peribulbar com NeoSTX além de promover dessensibilização efetiva, prolongou significativamente o tempo de analgesia pós-operatória.

Os resultados do atual estudo demonstraram que a NeoSTX foi tão efetiva quanto à bupivacaína, possibilitando a realização do procedimento cirúrgico em 100% dos animais, sem a necessidade de suplementação analgésica intraoperatória ou incremento da concentração do isoflurano. Além disso, no G-NeoSTX o requerimento de anestésico inalatório foi inferior em relação ao G-Bupi, efeito que não era esperado, visto que estudos prévios reportaram dessensibilização efetiva e de longa duração utilizando o bloqueio peribulbar com bupivacaína em cães submetidos a diferentes procedimentos oftálmicos (Shilo-Benjamini et al., 2014, Shilo-Benjamini et al. 2019). A redução do isoflurano observada no G-NeoSTX sugere que a neosaxitoxina possa ter proporcionado um bloqueio sensorial mais efetivo em relação à bupivacaína. Contudo, estudos adicionais são necessários para um melhor esclarecimento do mecanismo de ação da NeoSTX, para que as diferenças dessa substância em relação aos AL clássicos sejam melhor esclarecidas.

799 Durante a cirurgia, os parâmetros cardiorrespiratórios não diferiram entre os
800 tratamentos e foram mantidos dentro dos limites fisiológicos para espécie, com exceção de 4
801 cães de cada grupo, que apresentaram bradicardia transitória, provavelmente devido à resposta
802 reflexa à vasoconstricção desencadeada pela dexmedetomidina administrada na medicação
803 pré-anestésica.

804 Consistente com estudos prévios que relataram analgesia prolongada com o uso da
805 NeoSTX em pacientes humanos (Rodríguez-Navarro et al. 2011, Manríquez et al, 2015), no
806 atual estudo o tempo de analgesia foi superior no G-NeoSTX, sendo necessária
807 suplementação analgésica entre 4 e 6 horas no G-Bupi e somente a partir de 12 horas no G-
808 NeoSTX, confirmando resultados prévios que demonstraram o bloqueio incisional com essa
809 toxina aumentou a duração da analgesia em pacientes humanos submetidos à colecistectomia
810 (Rodríguez-Navarro et al, 2011). Ademais, os resultados do presente estudo sugerem que o
811 bloqueio sensitivo proporcionado pela NeoSTX foi mais longo em relação ao da bupivacaína,
812 visto que às 18 e 24 horas após a extubação traqueal, valores inferiores de sensibilidade da
813 córnea foram registrados no G- NeoSTX em relação ao G-Bupi. Resposta semelhante foi
814 observada em voluntários humanos, nos quais foi constatado aumento significativo no limiar
815 nociceptivo térmico até 24 horas após o bloqueio infiltrativo subcutâneo com NeoSTX
816 (Rodríguez-Navarro et al, 2007). No entanto, esses resultados devem ser analisados com
817 cautela, pois a centralização do globo ocular foi significativamente mais tardia no G-NeoSTX,
818 indicando que o período de latência para o bloqueio motor foi maior nesse grupo em relação
819 ao G-Bupi. Dessa forma, é possível que o retorno do bloqueio motor também tenha sido
820 prolongado e possa ter interferido na avaliação da sensibilidade da córnea, visto que a
821 resposta à estesiometria era considerada positiva quando o animal piscava.

822 Com relação aos escores de dor, não foram constatadas diferenças significativas entre
823 os grupos. Resultados divergentes foram observados em suínos submetidos à orquiectomia,

nos quais o bloqueio intratesticular com NeoSTX reduziu os escores de dor em relação ao tratamento com lidocaína nas primeiras 2 horas após a cirurgia (Valenzuela et al, 2019). Embora esses resultados não possam ser diretamente comparados, devido às espécies avaliadas e os procedimentos cirúrgicos efetuados não serem os mesmos, a principal diferença deve estar associada ao anestésico local utilizado no grupo controle em cada estudo, pois diferente da lidocaína que apresenta curta duração de ação (Park et al, 2010) a bupivacaína confere longo bloqueio sensitivo residual (Ahn et al, 2013, Chow et al, 2015) reduzindo possíveis diferenças entre os grupos, sobretudo no pós-operatório imediato. Ademais, como a hipótese do atual estudo foi o aumento no tempo de analgesia pela NeoSTX, o tamanho amostral foi calculado com base nessa variável. Dessa forma, é possível que o número de animais estudados tenha sido insuficiente para detectar diferenças significativas nos escores de dor, introduzindo um erro do tipo II na análise estatística. Além disso, os escores de dor e suas AUCs correspondentes foram calculadas excluindo da análise estatística os animais que receberam analgesia de resgate, o que reduziu ainda mais o tamanho amostral, aumentando a probabilidade do erro tipo II. No entanto, para reduzir o viés gerado pelo resgate analgésico na escala de dor, optou-se pela análise estatística somente dos animais que não receberam suplementação analgésica. A sedação também pode prejudicar a avaliação da eficácia analgésica de diferentes tratamentos, devido alterar o comportamento dos animais. Contudo, no atual estudo a sedação aparentemente não influenciou o diagnóstico da dor, pois em ambos os grupos, escores mais elevados em relação ao basal foram observados apenas até a primeira hora após a extubação, o que já era esperado devido ao efeito residual dos fármacos empregados no protocolo anestésico.

Consistente com resultados prévios reportados em ratos e seres humanos (Rodriguez-Navarro et al. 2007, Rodriguez-Navarro et al. 2009; Templin et al. 2015) não foram observados no atual estudo efeitos adversos ou sinais compatíveis com intoxicação como

convulsão, disforia, hipotensão e taquicardia (Dickerson, Apfelbaum 2014; Lemke, Dawson 2000) nos animais tratados com NeoSTX, sugerindo que na dose empregada essa substância é segura para realização de bloqueio peribulbar em cães.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo, sugere-se que a NeoSTX pode ser utilizada com sucesso e segurança no bloqueio peribulbar de cães, com a vantagem de prolongar a analgesia em relação à bupivacaína.

REFERÊNCIAS

- Ahn J, Jeong M, Lee E, Kim S, Park S, Park S, Kang S, Lee I, Seo K. Effects of peribulbar anesthesia (sub-Tenon injection of a local anesthetic) on akinesia of extraocular muscles, mydriasis, and intraoperative and postoperative analgesia in dogs undergoing phacoemulsification. *Am J Vet Res.*74: 1126-1132, 2013.
- Alonso E, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. Evaluation of toxicity equivalent factors of paralytic shellfish poisoning toxins in seven human sodium channels types by an automated high throughput electrophysiology system. *Arch Toxicol.* 90:479-488, 2016.
- Andrade AL, Galera PD, Araújo RLS, Conceição LF. Afecções da córnea. In: *Oftalmologia Veterinária – Clínica e Cirurgia*, Angélica de Mendonça Vaz Safatle e Paula Galera Diniz, 1 edição, Editora Payá, São Paulo, 2023, cap. 16: 413-437.
- Briley JD, Washington D, Westermeyer HD, Posner LP, Chiavaccini L. Comparison of a blind and an ultrasound-guided technique for retrobulbar anesthesia in dogs undergoing unilateral subconjunctival enucleation. *Vet Ophthalmol.* 2023.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 26:13-25, 2000.

- 874 Catterall WA, Morrow CS, Hartshorne RP: Neurotoxin binding to receptor sites associated
875 with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent-solubilized brain
876 membranes. *J Biol Chem* 254:11379–11387, 1979.
- 877 Chow DW, Wong MY, Westermeyer HD. Comparison of two bupivacaine delivery
878 methods to control postoperative pain after enucleation in dogs. *Vet Ophthalmol.*
879 18:422-428, 2015.
- 880 Cusick KD, Sayler GS. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics,
881 molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar Drugs.* 11:991-
882 1018, 2013.
- 883 Dickerson DM, Apfelbaum JL. Local anesthetic systemic toxicity. *Aesthet Surg J.* 2014
884 Sep;34(7):1111-9.
- 885 Fink BR. The long and the short of conduction block. *Anesth Analg.* 68: 553-555, 1989.
- 886 Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG,
887 Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN,
888 Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 28:365-368,
889 2000.
- 890 Kaye AD, Edinoff AN, Yan JY, Kaye AJ, Alvarado MA, Pham AD, Chami AA, Shah RJ,
891 Dixon BM, Shafeinia A, Cornett EM, Fox C. Novel local anesthetics in clinical
892 practice: pharmacologic considerations and potential roles for the future. *Anesth Pain*
893 *Med.*12: e123112, 2022.
- 894 Kern TJ. Ulcerative keratitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*20:643-666, 1990.
- 895 Kohane DS, Lu NT, Gökgöl-Kline AC, Shubina M, Kuang Y, Hall S, Strichartz GR, Berde
896 CB. The local anesthetic properties and toxicity of saxitoxin homologues for rat sciatic
897 nerve block in vivo. *Reg Anesth Pain Med.* 25:52-59, 2000.

- 898 Lobo K, Donado C, Cornelissen L, Kim J, Ortiz R, Peake RW, Kellogg M, Alexander ME,
 899 Zurakowski D, Kurgansky KE, Peyton J, Bilge A, Boretsky K, McCann ME, Berde CB,
 900 Cravero J. A Phase 1, Dose-escalation, double-blind, block-randomized, controlled trial
 901 of safety and efficacy of neosaxitoxin alone and in combination with 0.2% bupivacaine,
 902 with and without epinephrine, for cutaneous anesthesia. *Anesthesiology*.123:873-885,
 903 2015.
- 904 Manríquez V, Castro Caperan D, Guzmán R, Naser M, Iglesia V, Lagos N. First evidence
 905 of neosaxitoxin as a long-acting pain blocker in bladder pain syndrome. *Int Urogynecol*
 906 *J.* 26:853-858, 2015.
- 907 Montero C, Riquelme G, Del Campo M, Lagos N. Neosaxitoxin, a paralytic shellfish
 908 poison phycotoxin, blocks pain and inflammation in equine osteoarthritis.
 909 *Toxicon*.204:5-8, 2021.
- 910 Myrna KE, Bentley E, Smith LJ. Effectiveness of injection of local anesthetic into the
 911 retrobulbar space for postoperative analgesia following eye enucleation in dogs. *J Am*
 912 *Vet Med Assoc.* 237:174-177, 2010.
- 913 Park SA, Park YW, Son WG, Kim TH, Ahn JS, Ahn JT, Kim SE, Lee I, Seo K. Evaluation
 914 of the analgesic effect of intracameral lidocaine hydrochloride injection on
 915 intraoperative and postoperative pain in healthy dogs undergoing phacoemulsification.
 916 *Am J Vet Res*.71: 216-222, 2010.
- 917 Rodríguez-Navarro AJ, Berde CB, Wiedmaier G, Mercado A, Garcia C, Iglesias V,
 918 Zurakowski D. Comparison of neosaxitoxin versus bupivacaine via port infiltration for
 919 postoperative analgesia following laparoscopic cholecystectomy: a randomized, double-
 920 blind trial. *Reg Anesth Pain Med.* 36:103-9, 2011.
- 921 Rodríguez-Navarro AJ, Lagos N, Lagos M, Braghetto I, Csendes A, Hamilton J, Figueroa
 922 C, Truan D, Garcia C, Rojas A, Iglesias V, Brunet L, Alvarez F. Neosaxitoxin as a local

- 923 anesthetic: preliminary observations from a first human trial. *Anesthesiology*.106:339-
924 345, 2007.
- 925 Shilo-Benjamini Y. A review of ophthalmic local and regional anesthesia in dogs and cats.
926 *Vet Anaesth Analg*. 46:14-27, 2019.
- 927 Shilo-Benjamini Y, Pascoe PJ, Maggs DJ, Hollingsworth SR, Strom AR, Good KL,
928 Thomasy SM, Kass PH, Wisner ER. Retrobulbar vs peribulbar regional anesthesia
929 techniques using bupivacaine in dogs. *Vet Ophthalmol*. 22:183-191, 2019.
- 930 Shilo-Benjamini Y, Pascoe PJ, Maggs DJ, Pypendop BH, Johnson EG, Kass PH, Wisner
931 ER. Comparison of peribulbar and retrobulbar regional anesthesia with bupivacaine in
932 cats. *Am J Vet Res*. 75:1029-1039, 2014.
- 933 Smith LJ, Bentley E, Shih A, Miller PE. Systemic lidocaine infusion as an analgesic for
934 intraocular surgery in dogs: a pilot study. *Vet Anaesth Analg*.31:53-63, 2004.
- 935 Spertus CB, Espinheira Gomes F, Martin-Flores M, Parry SA, Ledbetter EC. Analgesic
936 effect of topical and subconjunctival morphine in dogs after phacoemulsification: A
937 pilot study. *Vet Ophthalmol*. 23:674-681, 2020.
- 938 Stiles J, Honda CN, Krohne SG, Kazacos EA. Effect of topical administration of 1%
939 morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs. *Am J Vet*
940 *Res*. 64: 813-818, 2023.
- 941 Templin JS, Wylie MC, Kim JD, Kurgansky KE, Gorski G, Kheir J, Zurakowski D, Corfas
942 G, Berde C. Neosaxitoxin in rat sciatic block: improved therapeutic index using
943 combinations with bupivacaine, with and without epinephrine. *Anesthesiology*.123:886-
944 898, 2015.
- 945 Valenzuela C, Torres C, Muñoz V, Simbaina JC, Sánchez A, Bustamante T, Sepúlveda
946 JM, Piron R, Del Campo M, Lagos N. Evaluation of Neosaxitoxin as a local anesthetic
947 during piglet castration: A potential alternative for Lidocaine. *Toxicon*.164:26-30, 2019.

- 948 Zibura AE, Posner LP, Ru H, Westermeyer HD. A preoperative bupivacaine retrobulbar
949 block offers superior antinociception compared with an intraoperative splash block in
950 dogs undergoing enucleation. *Vet Ophthalmol.* 23:225-233, 2020.
- 951 Zimmer T: Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system. *Mar Drugs*
952 8:741–762, 2010.
- 953 Wagner MC, Hecker KG, Pang DSJ. Sedation levels in dogs: A validation study. *BMC Vet*
954 *Res.* 13:1–8, 2017.
- 955 Wilkie DA, Whittaker C. Surgery of the cornea. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*
956 27:1067-1107, 1997.
- 957 Wylie MC, Johnson VM, Carpino E, Mullen K, Hauser K, Nedder A, Kheir JN,
958 Rodriguez-Navarro AJ, Zurakowski D, Berde CB. Respiratory, neuromuscular, and
959 cardiovascular effects of neosaxitoxin in isoflurane-anesthetized sheep. *Reg Anesth Pain*
960 *Med.* 37:152-158, 2012.
- 961 Yang AY, Chow J, Liu J. Corneal Innervation and Sensation: The eye and beyond. *Yale J*
962 *Biol Med.*91:13-21, 2018.

TABELAS

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão do peso corpóreo, idade, dose de propofol, tempo de anestesia, tempo de cirurgia, tempo de extubação, tempo de recuperação pós-anestésica, e tempo de centralização ocular de cães submetidos à ceratoplastia reconstrutiva tratados com bloqueio retrobulbar com neosaxitoxina (G-NeoSTX, $n = 11$) ou bupivacaína (G-Bupi, $n = 11$). †Diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, Teste de Tukey).

Variáveis	G-NeoSTX	G-Bupi	Valor de P
Peso (kg)	$6,6 \pm 2,3$	$5,4 \pm 1,2$	0,18
Idade (anos)	$5,5 \pm 3$	$5,0 \pm 2$	0,58
Dose propofol (mg/kg)	$3,9 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,2$	0,74
Tempo Anestésico (min)	$63 \pm 10^\dagger$	72 ± 10	0,05
Tempo Cirúrgico (min)	$29 \pm 9,8$	$35 \pm 10,5$	0,17
Tempo de Extubação (min)	$4,3 \pm 0,8$	$4,4 \pm 1,5$	0,86
Tempo de Recuperação (min)	17 ± 3	$20 \pm 5,4$	0,07
Tempo de Centralização (min)	$24,4 \pm 4,2^\dagger$	$14,2 \pm 3,6$	0,0001

† Diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$, teste t não pareado)

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica, média e diastólica (PAS, PAM, PAD), concentração final expirada de dióxido de carbono (ETCO₂), frequência respiratória (*f*) e concentração final expirada de isoflurano (ETiso) de cães submetidos à ceratoplastia reconstrutiva tratados com bloqueio peribulbar com neosaxitoxina (G-NeoSTX, *n* = 11) ou bupivacaína (G-Bupi, *n* = 11).

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
FC (bat/min)						
G-NeoSTX	69±10	66±11	68±11	64±14	66±16	67±17
G-Bupi	75±7	73±18	71±18	66±14	71±12	68±15
PAS (mmHg)						
G-NeoSTX	106±8	102±10	106±12	108±13	104±9	105±10
G-Bupi	113±19	112±21	110±16	108±15	107±14	105±13
PAM (mmHg)						
G-NeoSTX	77±11	78±15	73±10	75±10	76±8	76±8
G-Bupi	77±11	75±15	75±9	74±7	74±6	72±6
PAD (mmHg)						
G-NeoSTX	69±13	70±14	66±13	66±12	66±10	67±10
G-Bupi	65±17	65±19	63±19	64±17	63±16	65±17
ETCO₂(mmHg)						
G-NeoSTX	38±3	39±4	37±2	37±2	37±2	37±2
G-Bupi	39±3	39±3	38±3	39±4	39±3	38±3
<i>f</i> (mov/min)						
G-NeoSTX	10±2	10±2	9±2	10±2	9±3	9±2
G-Bupi	11±2	10±3	11±4	11±4	12±4	13±4
ETiso (V%)						
G-NeoSTX	0,9±0,1	0,72±0,1†	0,79±0,1	0,78±0,1†	0,75±0,1†	0,69±0,1†
G-Bupi	1,0±0,2	1,0±0,3	0,88±0,1	0,92±0,2	0,93±0,2	0,94±0,1

T0 = 10 minutos após Etiso 1%, T1 = 10 minutos após o bloqueio, T2 = início da cirurgia (20 minutos após o bloqueio), T3, T4 e T5 = 10, 20 e 30 minutos após o início da cirurgia, respectivamente. †Diferença significativa entre os grupos (*P* < 0,05, Teste de Tukey).

Tabela 3. Suplementação analgésica administrada ao longo das 24 horas após a realização de ceratoplastia reconstrutiva em cães tratados com bloqueio retrobulbar com neosaxitoxina (G-NeoSTX, $n = 11$) ou bupivacaína (G-Bupi, $n = 11$).

Grupo	Período pós-operatório (h)								Doses (n)	Cães (n)
	1	2	4	6	8	12	18	24		
G-NeoSTX	0	0	0	0	0	2	2	0	4	4/11
G-Bupi	0	0	3	1	0	0	0	0	4	4/11

FIGURAS



Figura 1. (A) Realização do bloqueio peribulbar com ultrassonografia. (B) Cão com globo ocular centralizado após 20 minutos da realização do bloqueio peribulbar.



Figura 2. Avaliação de sensibilidade da córnea mensurada com o estesiômetro de Cochet-Bonnet.

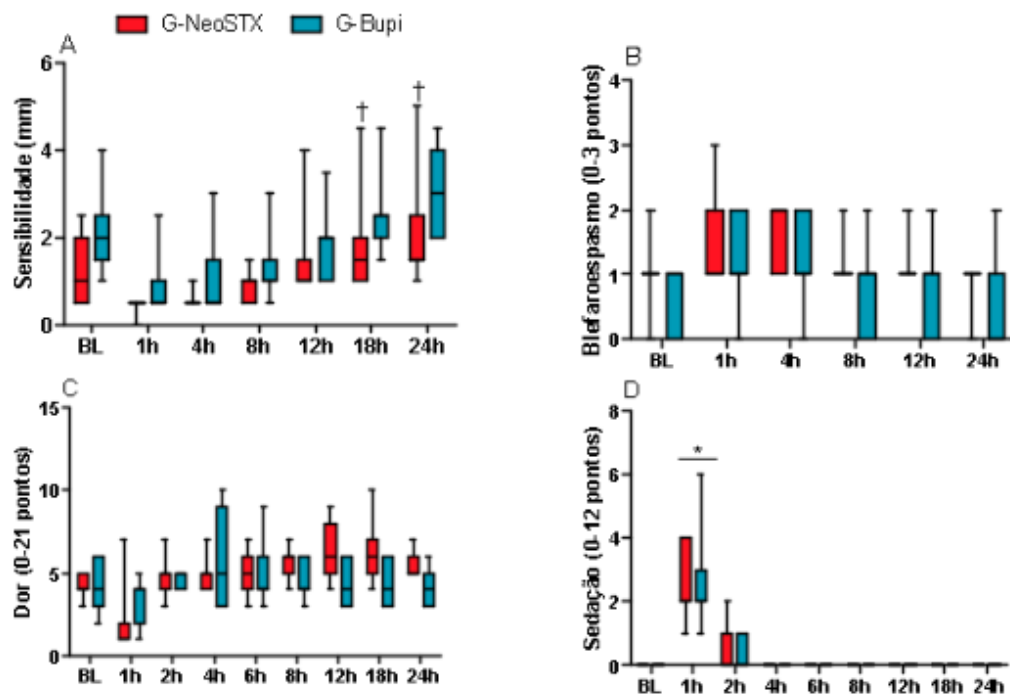


Figura 3. Mediana e amplitude da sensibilidade da córnea (A) e dos escores de blefaroespasm (B), dor (C) e sedação (D) mensurados no período pré-operatório (BL) e durante 24 horas após a realização de ceratoplastia reconstrutiva em cães tratados com bloqueio peribulbar com neosaxitoxina (G-NeoSTX, $n = 11$) ou bupivacaína (G-Bupi, $n = 11$).

†Diferença significativa entre os grupos (teste de Mann-Whitney, $p = 0,02$); *Diferença significativa em relação ao basal (Teste de Friedman, $p < 0,0001$).

**ANEXO 1 - ESCALA DE DOR MODIFICADA DA UNIVERSIDADE DE
MELBOURNE PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE BLEFAROESPASMO**

Escore	Critério
0	A pálpebra está completamente aberta ou posição normal
1	A pálpebra está parcialmente fechada ou a abertura palpebral está diminuída em 1/3
2	A pálpebra está parcialmente fechada ou a abertura palpebral está diminuída em 2/3
3	A pálpebra está completamente fechada

Fonte: Spertus et al (2020)

ANEXO 2 - ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DOR OFTALMOLÓGICA

Características	Escore	Critério
Conforto	0	Adormecido ou calmo
	1	Acordado e interessado no ambiente
	2	Agitação leve ou deprimido e desinteressado no ambiente
	3	Agitação moderada, inquieto e desconfortável
	4	Extremamente agitado ou se debatendo
Movimentos	0	Quieto
	1	1-2 mudanças de posição /min
	2	3-6 mudanças de posição/min
	3	Mudança de posição contínua
Aparência do olho tratado	0	Normal
	1	Alterações leves (olho afetado parcialmente fechado)
	2	Alterações moderadas (piscar, ou protusão da terceira pálpebra do olho afetado)
	3	Alterações graves (olho afetado continuamente fechado ou arranhando o olho)
Comportamento	0	Muito calmo para avaliar
	1	Normal
	2	Pequenas mudanças
	3	Moderadamente anormal (menos móvel ou alerta do que o normal, inconsciente do ambiente ou inquieto)
	4	Anormal (muito inquieto, vocalizando automutilando-se, grunhindo ou olhando para o fundo da gaiola)
Comportamento interativo	0	Muito calmo para avaliar
	1	Normal
	2	Afastamento ou blefaroespasmos quando o local cirúrgico é tocado; móvel
	3	Vocaliza quando a ferida é tocada e reluta em se mover, mas o fará quando persuadido
	4	Reação violenta ao toque no local da cirurgia, mordendo, rosnando quando se aproxima ou falha em se mover quando persuadido
Vocalização	0	Quieto
	1	Vocaliza, mas responde a voz baixa e carícias
	2	Vocalização intermitente, sem resposta à voz baixa e carícias
	3	Vocalização constante (incomum para este cão em particular), sem resposta a carícias ou voz

Fonte: adaptado de Smith et al. (2004)

ANEXO 3 - ESCALA DE SEDAÇÃO PARA CÃES (FORMA ABREVIADA)

1. Postura

- em pé = 0
 - sonolento, mas em pé = 1
 - deitado, mas capaz de se levantar = 2
 - deitado, com dificuldade para se levantar = 3
 - incapaz de se levantar = 4
-

2. Posição dos olhos

- central = 0
 - rotacionado, sem a terceira pálpebra = 1
 - rotacionado e encoberto pela terceira pálpebra = 2
-

3. Resposta ao ruído (palmas)

- reação normal (gira a cabeça em direção ao ruído) = 0
 - reação reduzida (gira pouco a cabeça/ mínimo movimento) = 1
 - reação mínima = 2
 - ausência de reação = 3
-

4. Aparência geral

- excitado = 0
 - acordado e normal = 1
 - tranquilo = 2
 - inconsciente = 3
-

Fonte: Wagner et al, 2017.

ANEXO 4 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO VETERINARY ANESTHESIA AND ANALGESIA

GUIDE FOR AUTHORS

Article structure

This section describes the article structure for this journal.

Sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Sections in the body of the manuscript (introduction to discussion) should not be separated by page breaks.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Excessive recycling of words from previous manuscripts, including the methods section, will not be allowed. See Elsevier's [Ethics in Research & Publication](#) brochure.

Specify in Materials and methods the ethical review committee approval process and the international, national, and/or institutional guidelines followed. Provide evidence in Materials and methods that the principles of reduction, refinement, and replacement have been met.

Statistics

For help with statistical reporting please refer to the [SAMPL Guidelines](#) which are available on the [Equator Network](#). Further useful information on best practices in reporting sample size calculations in Randomized Controlled Trials in the field of anaesthesia can be found in the following British Journal of Anaesthesia article: '[Pitfalls in reporting sample size calculation in randomized controlled trials published in leading anaesthesia journals: a systematic review](#)'.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Ideally 12 words or fewer
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled and in the correct order. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, and which author will be the corresponding author post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the pre-publication corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If the first author who is not the corresponding post-publication author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. This information should be provided on the title page upon manuscript submission. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.
- **Acknowledgments (including sources of funding)**
- **Authors' contributions**
- **Conflict of interest statement**

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, references should not be included in the abstract. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be on a separate page and should not exceed 300 words. For original research articles and short communications, a structured abstract should be used with the following titles: Objective, Study design, Animals or Animal population, Methods, Results, Conclusions and clinical relevance. For review articles and "What is the Evidence?" articles the abstract should be structured and usually should have the following headings: Objective, Databases used and Conclusions.

Keywords

Up to six keywords or phrases should be listed immediately after the abstract. Ideally, they should be [MeSH headings](#).

Please use either British English or American English spelling (ensuring that this is consistent with the spelling used throughout the body of your manuscript) and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations at their first mention in the body of the manuscript (introduction through discussion). Ensure consistency of abbreviations throughout the article. A list of commonly used abbreviations is available [here](#).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should rarely be used. If used, indicate the position of the footnote in the text and present the footnote separately at the end of the article.

Artwork

This section describes the artwork for this journal.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their legends, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 600 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 600 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., PowerPoint, GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used in the legend.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images, Excel files, or embedded in Word files. Tables should be placed on separate page(s) at the end after the references list or in a separate file. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. The caption should be placed above the table and explain the origin of the data and any table notes should be placed below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

This section describes the references for this journal.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: Clutton RE (2017) Recognizing the boundary between heroism and futility in veterinary intensive care. *Vet Anaesth Analg*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaa.2016.11.004> Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by

including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference style

Please follow the following guidelines when formatting the reference list in your manuscript:

- Abstracts that are more than 2 years old should not be used as references. Avoid abstracts as references when at all possible.
- Proceedings should not be used as references.
- References cited within the text that are 'unpublished observations' or 'personal communications' should not be included in the reference list. Authors are responsible for verifying that the information provided under these headings is accurate and approved by the persons concerned. Information from manuscripts that have been submitted but not accepted should be cited as unpublished observations.
- A modified Harvard style should be used in the reference list.
- Cite the author names followed by year of publication: (Jones 1997; Gregory 1999).
- Where there are two authors, they should both be included with an ampersand: (Pascoe & Bennett 1999)
- Where there are three or more authors, the first author's name followed by et al. should be used: (Williams et al. 2016).
- If there is more than one reference per year from an author then distinguish with a letter: (Williams et al. 2016a) (Jones et al. 2016a,b)
- A detailed reference list should be supplied on a separate page, listed in alphabetical order of first author names.
- Journal titles should be abbreviated according to the standard forms in the National Library of Medicine, USA, database (MEDLINE or PubMed).
- Book titles should be written out in full.
- An EndNote style download is available [here](#).
- The following are examples of style:

Journal

Argaves WS, Suzuki S (1987) Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* 105, 1183-1190.

Andrade C, Sandarsh S, Chethan KB, Nagesh KS (2010) Serotonin reuptake inhibitor antidepressants and abnormal bleeding: a review for clinicians and a reconsideration of mechanisms. *J Clin Psychiatry* 71, 1565-1575.

Young LE, Blissitt KJ, Clutton RE et al. (1998) Temporal effects of an infusion of dobutamine hydrochloride in horses anesthetized with halothane. *Am J Vet Res* 59, 1027-1032.

Campagna I, Schwarz A, Keller S et al. (2015) Comparison of the effects of propofol or alfaxalone for anaesthesia induction and maintenance on respiration in cats. *Vet Anaesth Analg* 42, 484-492.

Larenza MP, Ringer SK, Kutter AP et al. (2009a) Evaluation of anesthesia recovery quality after low-dose racemic or S-ketamine infusions during anesthesia with isoflurane in horses. *Am J Vet Res* 70, 710-718.

Larenza MP, Peterbauer C, Landoni MF et al. (2009b) Stereoselective pharmacokinetics of ketamine and norketamine after constant rate infusion of a subanesthetic dose of racemic ketamine or S-ketamine in Shetland ponies. *Am J Vet Res* 70, 831-839.

Conde Ruiz C, Del Carro A, Rosset E et al. (2015) Alfaxalone for total intravenous anaesthesia in bitches undergoing elective caesarean section and its effects on puppies: a randomized clinical trial. *Vet Anaesth Analg*. <https://doi.org/10.1111/vaa.12298> [Epub ahead of print].

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J et al. (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 6, e1000097.

[No authors listed] (2013) Notice of formal retraction of articles by Dr. Y. Fujii. *Br J Anaesth* 110, 669.

Book

Hall LW, Taylor PM (1994) *Anaesthesia of the Cat* (1st edn), Balliere Tindall, London, UK, pp. 189-193.

Pascoe PJ, Bennett RC (1999) Thoracic Surgery. In: *Manual of Small Animal Anaesthesia and Analgesia* (1st edn). Seymour C, Gleed R (eds). BSAVA, UK. pp. 183-196.

Abstract

Portela D, Campoy L, Otero P et al. (2015) Ultrasound-guided thoracic paravertebral injection in dog cadavers. *Vet Anaesth Analg* 42, A55 (abstract).

Web address

Seeler DC, Turnwald GH, Bull KS (1999) From teaching to learning: Part III. Lectures and approaches to active learning. *J Vet Med Educ* 21 <http://scholar.lib.vt.edu/ejournals/JVME/V21-1/Seeler1.html> Last accessed 1 January 2017.

Thesis

Smith GY (1978) Title of thesis. PhD thesis, University. pp. 97-112.

Journal abbreviations

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our

recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

After acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is

sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author inquiries

Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO LABORATORY ANIMALS

Your article must be within the scope of the journal and be of sufficient quality. If not, it will not be reviewed. Please read the journal's [Aims and Scope](#) to see if your article is appropriate.

The manuscript must be your original work, you must have the rights to the work, and you must have obtained and be able to supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you, including figures, illustrations, tables, lengthy quotations, or other material previously published elsewhere.

Article types

Please note that LAJ prioritizes original research over other types of articles.

Please visit the Sage Journal Author Gateway for [guidance on producing visual and/or video abstracts](#).

Original

Articles

Articles describing substantial original research that fall within the aims and scope of the journal. These should be up to 5,500 words including the abstract, figure/table captions and references and have no more than six displays (figures and tables). Original Research Articles must comply with the [ARRIVE 2.0 Guidelines](#). Structured headings are required and must include: Title, Abstract, Introduction; Animals, Material and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements, References, Data Availability Statement, Conflict of Interest Statement, and Funding. The abstract must be unstructured and consist of a single paragraph with fewer than 250 words. For manuscripts whose word counts exceed 5,500 or more than six displays, the additional information and displays can be submitted as supplementary information.

Working

Group

Reports

Articles describing the recommendations or conclusions from working parties or groups mandated by one or more subscribing associations. These should be up to 7,500 words including references (of which there should be no more than 50), abstract, figure/table captions and the abstract. A hyperlink to additional information or the full deliberations of the Working Group will be accommodated and hosted as supplementary information on the journal website. All cited members of working parties will be considered as authors for the purposes of copyright.

Submissions are initially accepted from [Subscribing Societies](#). Group reports from specific theme-based meetings- may be considered if there is a clear broader impact in the laboratory animal community. Reports with a strong and restricted focus /emphasis on a unique country will not be accepted. For any documents proposing new guidance or monitoring protocols, we strongly suggest authors provide evidence-based data to support the impact of their proposed platforms.

Review

Articles

LAJ prioritizes Review Articles on novel methodologies or high-impact topics with regards to animal welfare and the 3Rs.

Literature Review Articles of a substantial and topical nature may be considered for publication in LAJ. These must be up to 7,500 words including abstract, figure/table captions and references.

Systematic

Reviews

LAJ prioritizes Systematic Reviews on novel methodologies or high-impact topics with regards to animal welfare and the 3Rs. Systematic reviews and Meta-Analysis must be written in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses ([PRISMA](#)) [Guidelines](#). We also encourage the authors to check the Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation ([SYRCLE](#)) [starting guidelines](#) before submission.

Please note that we only accept systematic reviews which are already preregistered.

Case

Reports

The journal also publishes case reports or case series ([Sánchez-Morgado et al., 2022](#)). Case reports and case series must report one of the following:

1. a) A new and/or emerging disease; b) A new association or variation in a disease process; c) An unreported or unusual adverse drug reaction; d) An unexpected or unusual presentation of a common problem or an unexpected event in the course of observing or treating an experimental animal that has not been previously reported; e) Findings that shed new light on the possible pathogenesis of a disease or an adverse effect; f) A case which could be used as a teaching exercise in deductive reasoning and clinicopathological correlation and/or a practical lesson for the investigation and/or management of similar cases.

Word count should not exceed 3,000 words, including abstract and references. Word count for the abstract should be 250 words. No more than 4 displays (tables and/or figures). Up to 30 references.

Short

Reports

Technical notes and preliminary communications with adequate methodological details and conclusions. These should have fewer than 1,500 words including abstract, figure/table captions and references. The abstract should have fewer than 200 words, and have no more than two figures or tables.

Letters

to

the

Editor

Letters to the Editor will be considered for publication but only on issues related to the scientific or ethical content of the journal, and authors will be given the opportunity to publish a reply to any letters.

LAS

Perspectives

Perspective or opinion papers as well as news on current laboratory animal science topics. Word count should not exceed 1,500 words, excluding references. No abstract is needed, no subheadings needed. No more than 2 displays (tables and/or figures). Up to 10 references. The LAJ Editorial team may ask suitable experts to write a comment on a LAS perspectives paper.

News

Items

Submissions are only accepted from [Subscribing Societies](#).

Submissions should be no more than 1,500 words including abstract and references. If two pictures are included the word limit reduces to 1,000 words. Articles can be in the language of the societies and/or in English. Contributions to the News section are not subject to peer review and they reflect the opinion of the subscribing society. If accepted for publication, authors will be required to provide contact details and sign an electronic copyright form. Questions may be sent to the Editorial Office at laeditorial@sagepub.co.uk.

Animal Ethical Considerations

Papers will only be published if the experimental procedures employed conform with the accepted principles of how animals are used in biomedical science. Usually, the principles applied will be those specified in the [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals](#) used for Experimental and Other Scientific Purposes and its appendices, the [National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).

According to the [ARRIVE Guidelines 2.0](#), which Laboratory Animals has endorsed:

The ethical statement must “provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study and any relevant license or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.”

Ethical considerations must be included in the methods section under the appropriate headings. At a minimum, authors must provide:

- A clear ethical justification, describing the ethical and welfare implications of the experimental design or procedures.
- Details of licenses or approvals from ethical review bodies. If ethical approval was not required, authors must explicitly state this and provide a detailed justification. For example, can the scientific objectives be achieved using techniques that do not require the use of animals? Or was it necessary for animals to be specifically killed to supply the tissue samples?
- Information on measures taken to minimize potential suffering, including sample size determination, pilot testing, and predefined humane endpoints, should be provided here. This section is intended to offer a concise summary of the strategies implemented to reduce suffering. It is not meant to duplicate the detailed descriptions found later in the Materials and Methods section, but rather to give authors and reviewers a quick overview.
- A detailed account of the fate of all animals used in the study.
- A description of steps taken to enhance animal welfare, such as, but not limited to, environmental enrichment.

By enforcing these standards, Laboratory Animals supports the responsible and ethical use of animals in research and fosters a culture of care that prioritizes animal welfare while advancing scientific knowledge.

The methodology for the euthanasia of animals should be consistent with recommendations of the AVMA Guidelines and the Directive 2010/63/EU, specifically [Annex IV](#), which outlines the acceptable methods for euthanizing animals used in scientific research within the EU. Please read the Editorial entitled '[You and your research report: implementing the ARRIVE Guidelines](#)' for further clarification.

Of particular note, the source and full strain nomenclature of any laboratory animal stock must be specified according to [international recommendations](#). Authors should note this information is available from source laboratories and animal vendors. A brief statement describing the legislative controls on animal care and use should be provided. Measures to refine experimental techniques to benefit animal welfare can be described in detail and the disposition and fate of the animals at the end of the experiment should be clear.

Products used (e.g. drugs, equipment, feed, bedding) should be described in the format “generic description (trade name, vendor name, city and country where vendor located)”.

The experimental design and the statistical analysis should be detailed, particularly in relation to using only the appropriate numbers of animals (see Festing M et al. [The Design of Animal Experiments: Reducing the use of animals in research through better experimental design 2nd Edition](#), available from Sage). Pre-test power analyses should be presented in justification of sample size or number of animals required whenever possible. Power analyses for many common statistical procedures both parametric and non-parametric are given in Zar J. *Biostatistical Analysis*, 4th edn. When reporting variability about the mean, variances, and/or discussing significance or non-significance of statistically derived values, the Zar recommendations should be considered, and claims of statistical non-significance should be accompanied by post-test power analyses whenever possible.

Furthermore, in research involving humans, whether through surveys, questionnaires, or sampling, an ethical statement issued by a competent ethics commission must be included. The statement should confirm that informed consent was obtained—or explain why it was deemed unnecessary,—state whether ethical approval was granted (if required), and specify the name of the ethics committee along with the approval number or identification. In case, the ethical commission decides not ethical approval is needed, a waiver statement mentioning the research does not need an ethical approval is enough. Regardless the decision, all statements should confirm that the research was conducted in accordance with relevant ethical standards, such as the Declaration of Helsinki (if appropriate). Moreover, the statement should include a description of how the data has been and will be managed and stored to ensure security, anonymity, and/or confidentiality.

More information on [ethics](#) is available through our publisher, Sage.

Clinical trial registration

The journal conforms to the [ICMJE requirement](#) that clinical trials are registered in a [WHO-approved public trials registry](#) at or before the time of first participant enrollment as a condition of consideration for publication. The trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract.

Reporting guidelines

Your manuscript **must** follow the relevant [EQUATOR Network reporting guidelines](#), depending on the type of study. The [EQUATOR wizard](#) can help identify the appropriate guideline. You will need to upload the appropriate checklist with your submission.

Other resources can be found at [NLM’s Research Reporting Guidelines and Initiatives](#).

If your research involves animals, you will be asked to confirm that you have carefully read and adhered to the [ARRIVE guidelines](#).

*Formatting your manuscript**Accepted file types*

Preferred formats for the text and tables of your manuscript are Word DOC, RTF, XLS. You do not need to follow a template, but please ensure your heading levels are clear, and the sections clearly defined.

LaTeX files are also accepted. A LaTeX template is available on the [Sage Journal Author Gateway](#).

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3cm for left and right hand margins and 5cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point.

Title

Your manuscript's title should be concise, descriptive, unambiguous, accurate, and reflect the precise contents of the manuscript. A descriptive title that includes the topic of the manuscript makes an article more findable in the major indexing services.

Abstract

Please include an unstructured abstract of 250 words between the title and main body of your manuscript that concisely states the purpose of the research, major findings, and conclusions. If your research includes clinical trials, the trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract. Submissions that do not meet this requirement will not be considered.

For clinical trials, the trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract.

This journal includes video abstracts.

Keywords

Please include between 1-5 keywords, listed after the abstract. Keywords should be as specific as possible to the research topic.

Artwork, figures, and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures, and graphs in electronic format, please read Sage's [artwork guidelines](#).

Figures supplied in color will appear in color online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. If you have requested color reproduction in the print version, we will advise you of the costs on receipt of your accepted article.

Please ensure that you have obtained any necessary permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures, or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please see the [Frequently Asked Questions page](#) on the Sage Journal Author Gateway.

Acknowledgments

If you are including an Acknowledgements section, this will be published at the end of your article. The Acknowledgments section should include all contributors who do not meet the

criteria for authorship. Per [ICMJE recommendations](#), it is best practice to obtain consent from non-author contributors who you are acknowledging in your manuscript.

Writing assistance and third party submissions: if you have received any writing or editing assistance from a third-party, for example a specialist communications company, this must be clearly stated in the Acknowledgements section and in the covering letter. Please see the [Sage Author Gateway](#) for what information to include in your Acknowledgements section. If your submission is being made on your behalf by someone who is not listed as an author, for example the third-party who provided writing/editing assistance, you must state this in the Acknowledgements and also in your covering letter. **Please note that the journal editor reserves the right to not consider submissions made by a third party rather than by the author/s themselves.**

Statements and declarations

Please include a section with the heading ‘Statements and Declarations’ at the end of your submitted article, after the Acknowledgements section [and Author Contributions section if applicable] including each of the sub-headings listed below. If a declaration is not applicable to your submission, you must still include the heading and state ‘Not applicable’ underneath. Please note that you may be asked to justify why a declaration was not applicable to your submission by the Editorial Office.

Ethical considerations

Please include your ethics approval statements under this heading, even if you have already included ethics approval information in your methods section. If ethical approval was not required, you need to explicitly state this. You can find information on what to say in your ethical statements as well as example statements on our [Publication ethics and research integrity policies page](#).

All papers reporting studies involving human participants, human data or human tissue must state that the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board approved the study, or waived the requirement for approval, providing the full name and institution of the review committee in addition to the approval number. If applicable, please also include this information in the Methods section of your manuscript.

Consent to participate

Please include any participant consent information under this heading and state whether informed consent to participate was written or verbal. If the requirement for informed consent to participate has been waived by the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board (i.e. where it has been deemed that consent would be impossible or impracticable to obtain), please state this. If this is not applicable to your manuscript, please state ‘Not applicable’ in this section. More information and example statements can be found on our [Publication ethics and research integrity policies page](#).

Consent for publication

Submissions containing any data from an individual person (including individual details, images or videos) must include a statement confirming that informed consent for publication was provided by the participant(s) or a legally authorized representative. Non-essential identifying details should be omitted. Please do not submit the participant’s actual written informed consent with your article, as this in itself breaches the patient’s confidentiality. The Journal requests that you confirm to us, in writing, that you have obtained written informed

consent to publish but the written consent itself should be held by the authors/investigators themselves, for example in a patient's hospital record. The confirmatory letter may be uploaded with your submission as a separate file in addition to the statement confirming that consent to publish was obtained within the manuscript text. If this is not applicable to your manuscript, please state 'Not applicable' in this section.

Declaration of conflicting interest

The journal requires a declaration of conflicting interests from all authors so that a statement can be included in your article. For guidance on conflict of interest statements, see our [policy on conflicting interest declarations](#) and the [ICMJE recommendations](#).

If no conflict exists, your statement should read: 'The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article'.

Funding statement

All articles need to include a funding statement, under a separate heading, **even if you did not receive funding**. You'll find guidance and examples on our [Funding](#) page.

Data availability

The Journal is committed to facilitating openness, transparency and reproducibility of research, and has the following research data sharing policy. For more information, including FAQs please [visit the Sage Research Data policy pages](#).

Subject to appropriate ethical and legal considerations, authors are encouraged to:

- Share your research data in a relevant public data repository
- Include a data availability statement linking to your data. If it is not possible to share your data, use the statement to confirm why it cannot be shared.
- Cite this data in your research

Reference style and citations

The journal follows the Sage Vancouver reference style. View the [Sage Vancouver guidelines](#) to ensure your manuscript conforms.

Please ensure you strictly adhere to the Vancouver referencing style. In the reference list, note that up to three (3) authors may be listed per reference. If there are more than three (3) authors, then list the first three names and represent the rest using et al. Journal titles need to be listed in italics.

Every in-text citation must have a corresponding citation in the reference list and vice versa. Corresponding citations must have identical spelling and year.

Authors should update any references to preprints when a peer reviewed version is made available, to cite the published research. Citations to preprints are otherwise discouraged.

EndNote

If you use [EndNote](#) to manage references, you can download the [Sage Vancouver EndNote output file](#)

Supplemental material

This Journal can host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc.) alongside the full text of the article. Your supplemental material must be one of our accepted file types. For that list and more information please refer to our [guidelines on submitting supplemental files](#).

English language editing services

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using Sage Author Services. Visit [Sage Author Services](#) for further information.

ANEXO 6 – Parecer da COMISSÃO de Ética de Uso de Animais (CEUA)

16/06/2025, 10:50

[unoeste.br/sgp2/Certificado/Ver/a9e0c842f40497a38fa75368a4ad24e5](https://www.unoeste.br/sgp2/Certificado/Ver/a9e0c842f40497a38fa75368a4ad24e5)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação/PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Bloqueio peribulbar com neosaxitoxina como alternativa à bupivacaína para o controle da dor perioperatória em cães submetidos à ceratoplastia reconstrutiva**", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 8242 e tendo como participante(s) **MATHEUS ROCHA RIBEIRO (discente)**, **DENIS ROBISON GOMES (discente)**, **DEBORA DA SILVA ALVES (discente)**, **BRUNO KENDI ARIGA (discente)**, **SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE (docente)**, **RAFAEL STUANI FLORIANO (docente)**, **RENATA NAVARRO CASSU (orientador responsável)**, foi avaliado e **Aprovado** pelo **Comitê Assessor de Pesquisa Institucional (CAPI)** e **Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido Aprovado em reunião realizada em 14/11/2023 00:00:00.

16/06/2025, 10:50

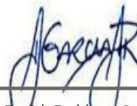
unoeste.br/sgp2/Certificado/Ver/a9e0c842f40497a38fa75368a4ad24e5

Vigência do projeto: 01/09/2023 a 01/09/2025 .

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Camundongo	30	20,00 gramas	45 dias	M	Biotério-Unicamp
canina	24	10,00 quilos	5 anos	M	Rotina Hospitalar - Unoeste

Presidente Prudente, 1 de dezembro de 2023.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Docente Responsável pela CPDI



Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger
Coordenador da CEUA - UNOESTE