



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Renata Haddad Pinho

**Responsividade, confiabilidade e interferência da
presença de um observador humano ao se avaliar a
dor pela expressão facial em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em
Anestesiologia

Orientador: Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu
2022

Renata Haddad Pinho

Responsividade, confiabilidade e interferência
da presença de um observador humano ao se
avaliar a dor pela expressão facial em coelhos

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em
Anestesiologia

Orientador: Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pinho, Renata Haddad.

Responsividade, confiabilidade e interferência da presença de um observador humano ao se avaliar a dor pela expressão facial em coelhos / Renata Haddad Pinho. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Stelio Pacca Loureiro Luna

Capes: 50501011

1. coelhos. 2. Animais de laboratório. 3. Avaliação da dor. 4. Dor. 5. Expressão facial.

Palavras-chave: Animais de laboratório; Avaliação da dor; Dor; Expressão facial.

RENATA HADDAD PINHO

Responsividade, confiabilidade e interferência da presença de um observador humano ao se avaliar a dor pela expressão facial em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Anestesiologia

Comissão examinadora:

Orientador: Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu

Dra. Daniela Campagnol
Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa Experimental
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Prof^a. Dra. Marilda Onghero Taffarel
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Pablo Ezequiel Otero
Universidad de Buenos Aires

Prof^a. Adj. Dra. Valéria Nobre Leal de Souza Oliva
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba

*Dedico este trabalho aos animais, que sempre serão minha maior
motivação.*

AGRADECIMENTOS

À minha família de Botucatu, meus colegas de trabalho e amigos, obrigada pela parceria e cuidado, em especial nos momentos difíceis de pandemia.

Aos amigos de São Paulo e Araçatuba, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes e me apoiaram em todas as fases da minha vida.

À minha querida mãe, pela compreensão e por ser fonte inesgotável de amor e carinho.

À Shakira, minha pequena-grande companheira de vida acadêmica desde o primeiro ano da graduação.

Aos colaboradores do projeto, pela dedicação ao estudo.

Aos funcionários da FMB e da FMVZ, em especial à Tatiane, Janete e Clara pelo auxílio e eficiência.

Aos membros da banca da qualificação e da defesa pela disponibilidade em compartilhar conhecimento e contribuir com este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa de doutorado - Código de financiamento 001.

Ao professor Stelio, querido orientador, mentor, por muitas vezes pai, amigo, e psicólogo, por todo conhecimento profissional e pessoal, por me ajudar na busca pelos meus sonhos e por vibrar com minhas conquistas.

*“O importante não é a casa onde moramos
mas onde, em nós, a casa mora.”*
Mia Couto

RESUMO

PINHO, R.H. **Responsividade, confiabilidade e interferência da presença de um observador humano ao se avaliar a dor pela expressão facial em coelhos** 38 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

Nas últimas décadas têm-se empregado escalas faciais como ferramentas para avaliar a dor em diversas espécies. Esse estudo objetivou avaliar a responsividade, confiabilidade e interferência de um observador humano nos escores da RbtGS (*Rabbit Grimace Scale*) por vídeo filmagens em coelhos submetidos à cirurgia ortopédica. Utilizaram-se os registros de 28 coelhos filmados como parte de outro estudo em quatro momentos: basal (24 horas antes da cirurgia); dor (1 hora após a recuperação anestésica); analgesia (3 horas após o resgate analgésico e 4 horas após a recuperação anestésica) e 24h (24 horas após a recuperação anestésica) na presença ou na ausência do observador. A RbtGS foi pontuada de forma encoberta e aleatória por três avaliadores. Avaliou-se a responsividade comparando-se os quatro momentos pelo teste de Friedman, seguido de Dunn. A interferência da presença ou ausência do observador em cada momento foi avaliada pelo teste de Wilcoxon. A confiabilidade intra e interobservador foi determinada pelo coeficiente de correlação intraclass (ICC). A escala foi responsiva, pois os escores aumentaram após o procedimento cirúrgico e reduziram após 24 horas. A presença do observador reduziu os escores da RbtGS no momento dor (presença: 0,75; 0-1,75, ausência: 1; 0-2) e aumentou nos momentos basal (presença: 0,2; 0-2, ausência: 0; 0-2) e 24h (presença: 0,33; 0-1,75, ausência: 0,2; 0-1,5). A confiabilidade intra e interobservador variou de moderada a muito boa (ICC > 0,49). A RbtGS apresentou responsividade, repetibilidade e reprodutibilidade na avaliação por vídeo filmagens em coelhos submetidos à cirurgia ortopédica. Na presença da observadora humana familiar aos coelhos, subestimou-se os escores de dor no momento de maior dor e superestimou-se a dor nos momentos de pouca ou nenhuma dor, sugerindo-se que as avaliações sejam realizadas remotamente. O número significativo de dados perdidos é uma limitação importante da RbtGS.

Palavras chave: Animais de laboratório, Avaliação da dor, Dor, Expressão facial.

ABSTRACT

PINHO, R.H. **Responsiveness, reliability and the influence of a human observer in the pain assessment by facial expressions in rabbits** 38 p.

Thesis (PhD) – Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, 2022.

In the last decades, facial pain scales have been used as tools to assess pain in several species. The goal of this study was to evaluate the responsiveness, the intra- and inter-observer reliability and the influence of a human observer on the scores of the RbtGS (Rabbit Grimace Scale) assessed by video recordings in rabbits subjected to orthopedic surgery. The videos of 28 rabbits recorded as part of another study were used as follows: baseline (24 hours before surgery); pain (one hour after anesthesia recovery); analgesia (3 hours after analgesic rescue); and 24h (24 hours after anesthetic recovery). The RbtGS was blindly and randomly evaluated by three evaluators. The responsiveness was assessed through comparison of scores at the four time points using Friedman test followed by Dunn post-hoc test. The influence of the observer at each time point was analyzed comparing the presence versus the absence of the observer using Wilcoxon test. Inter and intra-observer reliability was assessed through the intraclass correlation coefficient (ICC). The scale showed responsiveness because scores increased following the surgical procedure and decreased by 24 hours. The presence of an observer decreased RbtGS scores at the painful moment (presence: 0,75; 0-1,75, absence:1; 0-2) and increased at baseline (presence: 0,2; 0-2, absence:0; 0-2) and at 24h (presence: 0,33; 0-1,75, absence:0,2; 0-1,5). Intra- and inter-observer reliability ranged from moderate to very-good (ICC >0,49). The RbtGS showed responsiveness, repeatability and reproducibility in video assessment of rabbits subjected to orthopedic surgery. In the presence of a woman and familiar observer, the scores at the time when pain was greatest were underestimated and at times of little to no pain, the presence of an observer overestimated RbtGS scores, thereby suggesting that evaluations should be performed remotely. An important limitation of the RbtGS is the significant number of lost data.

Keywords: Facial expressions, Laboratory animals, Pain, Pain measurements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão facial de um coelho sem (a) e com dor (b).....19

Figura 2 - Exemplo de escores da Rabbit Grimace Scale.....20

Figura 3 - Gráficos de frequência de ocorrência dos escores de cada item e dados perdidos da Rabbit Grimace Scale.....24

Figura 4 – Gráficos de caixas da responsividade da Rabbit Grimace Scale.....25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Confiabilidade intra-observador da Rabbit Grimace Scale.....26

Tabela 2 - Confiabilidade inter-observador da Rabbit Grimace Scale.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 R'S – reduzir, substituir e refinar (*replace, reduce and refinement*)

CANCRS – Escala composta para avaliar e quantificar a dor em coelhos

CI – intervalo de confiança

cm – centímetro

cm³ – centímetro cúbico

CO₂ – gás carbônico

FAU – unidade de ação facial

h – hora

ICC – coeficiente de correlação intraclass

IM – intramuscular

IV – intravenosa

Kg – quilograma

L – litro

MA – todos os momentos agrupados

mg – miligrama

µg – micrograma

min – minuto

ml – mililitro

RbtGS – *Rabbit Grimace Scale* (escala facial para avaliar a dor em coelhos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. HIPÓTESES E OBJETIVO	15
3. MATERIAL E MÉTODO	16
3.1 Animais e delineamento	16
3.2 Vídeo gravações	18
3.3 Avaliação dos vídeos	19
3.4 Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Frequência de ocorrência e dados perdidos	23
4.2 Responsividade e influência da presença do observador.....	25
4.3 Confiabilidade	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

O homem e outros animais expressam na face diferentes emoções como o medo, a alegria, a tristeza e a dor de modo semelhante (DARWIN, 1872). A alteração na expressão facial é uma ferramenta eficaz para identificar a dor em pacientes não verbais, como neonatos humanos e idosos com demência (GRUNAU; CRAIG, 1987; OOSTERMAN et al., 2016).

Em animais, desenvolveram-se escalas para avaliar a dor com base na expressão facial para diversas espécies (DALLA COSTA et al., 2014; GLEERUP et al., 2015; DI GIMINIANI et al., 2016; HÄGER et al., 2017; REIJGWART et al., 2017; EVANGELISTA et al., 2019), incluindo os animais de laboratório (LANGFORD et al., 2010; SOTOCINAL et al., 2011; KEATING et al., 2012).

A Rabbit Grimace Scale (RbtGS) (KEATING et al., 2012) foi criada com base na Mouse Grimace Scale (MGS) (LANGFORD et al., 2010) e na Rat Grimace Scale (RGS) (SOTOCINAL et al., 2011) a partir do registro fotográfico realizado durante a tatuagem das orelhas de coelhos de laboratório. A escala compreende cinco unidades de ação facial (FAUs) correspondentes ao aperto orbital, formato do nariz, achatamento das bochechas, posição das vibrissas e posição das orelhas, cada uma pontuada como 0 (ausente), 1 (moderadamente presente) ou 2 (obviamente presente) (KEATING et al., 2012).

Além do seu emprego como método de avaliação da dor em coelhos de laboratório (DIVINCENTI; MEIRELLES; WESTCOTT, 2016; HEDENQVIST et al., 2016; RAILLARD et al., 2019) também utilizou-se a RbtGS para avaliar a dor em coelhos de estimação (BANCHI et al., 2020). Em uma revisão sistemática recente sobre as escalas faciais, considerou-se a RbtGS uma ferramenta com

moderado nível de evidência para se avaliar a dor, devido aos poucos estudos que avaliaram a validade e confiabilidade da escala (EVANGELISTA; MONTEIRO; STEAGALL, 2021).

Um ponto crucial na avaliação da expressão facial é que quando o animal não estiver em posição com a face visualizável pela avaliação remota de câmeras ou pelo observador ao vivo, pode ser necessária a manipulação do animal para se obter uma boa imagem. A contenção física durante o reconhecimento da dor não é ideal, pois prejudicou a avaliação das expressões faciais em cordeiros (GUESGEN et al., 2016), daí se recomendar métodos de avaliação em que o animal possa expressar seus comportamentos naturais sem interferência humana (EVANGELISTA et al., 2019). A presença do observador humano do sexo masculino reduz as expressões faciais de dor em roedores (SORGE et al., 2014). Em coelhos com dor a presença do observador reduz a duração e a frequência de comportamentos expressivos de dor, o que poderia levar a falsa interpretação de que o coelho está desprovido de dor ou sofrendo menos dor do que o real (diagnóstico falso negativo). Por outro lado, o observador quando presente também inibe a expressão do comportamento normal nos coelhos desprovidos de dor, o que possibilita a falsa impressão que o animal sofreria dor (diagnóstico falso positivo) (PINHO et al., 2020). Desta forma há uma lacuna a se preencher para se saber se a presença do observador interfere na RbtGS.

Um outro ponto que merece uma reflexão quando se usa escalas de expressão facial é o tipo de registro que se faz das imagens. Expressões faciais que se sustentam por determinado tempo podem ser facilmente reconhecidas durante a avaliação presencial. Por outro lado, identificam-se mais facilmente

alterações sutis e de duração mais breve ao se avaliar uma imagem estática como fotografias ou screenshots de vídeos (DESCOVICH et al., 2017). Já as vídeo filmagens que representam uma alternativa a avaliação presencial, com a possibilidade de re-avaliação, não são comumente empregadas na avaliação de escalas faciais de dor.

A RbtGS foi avaliada apenas por fotografias (KEATING et al., 2012; HEDENQVIST et al., 2016) e presencialmente (RAILLARD et al., 2019; BANCHI et al., 2020), carecendo de um estudo por vídeo. Um outro ponto que requer definição quando do uso da RbtGS é que embora tenha-se avaliado sua responsividade e confiabilidade interobservadores (KEATING et al., 2012; BANCHI et al., 2020), ainda não se avaliou sua confiabilidade intraobservador.

2. HIPÓTES E OBJETIVOS

Este estudo objetivou avaliar a interferência de um avaliador presencial nos escores da RbtGS, e sua responsividade, repetibilidade e reprodutibilidade na avaliação por vídeo filmagens, a partir da hipótese que o instrumento é responsivo e confiável e que a presença de um observador altera a expressão facial de coelhos com ou sem dor.

3. MATERIAL E MÉTODO

O estudo seguiu a legislação brasileira do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o protocolo nº 0156/2018 e 0191/2021 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp Câmpus de Botucatu e abrangeu dois dos princípios dos 3 R's (redução e refinamento) (RUSSEL; BURCH, 1959). Trata-se de um estudo oportunista (redução), que objetiva promover o bem-estar animal por estudar uma ferramenta para avaliar a dor (refinamento).

3.1 Animais e delineamento experimental

Utilizaram-se as gravações de coelhos submetidos à cirurgia ortopédica como parte de um estudo de um grupo de pesquisas sobre cirurgia veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Câmpus de Jaboticabal (não publicado), filmados para o desenvolvimento de um etograma (PINHO et al., 2020) e uma escala comportamental para se avaliar a dor (não publicado) como descrito abaixo. Informações mais detalhadas podem ser encontradas no artigo que desenvolveu o etograma (PINHO et al., 2020).

Empregaram-se vinte e oito coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, dos quais 11 fêmeas e 17 machos com 159 ± 5 (150 – 165) dias de idade e peso médio de $3,7 \pm 0,38$ (2,95 – 4,5)kg, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

Selecionaram-se os animais saudáveis após exames laboratorial (hemograma) e físico, mediante a inspeção, auscultação cardíaca, respiratória e mensuração da temperatura retal.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de inox com dimensões de 60 cm³, com fornecimento de água e ração seca *ad libitum*, pedaços de cenoura diariamente, feno de tifton (*Cynodon spp.*) duas vezes por semana e pinha de eucalipto como método de enriquecimento ambiental.

Como protocolo anestésico, os coelhos foram pré-medicados com 5 mg/kg de petidina por via intramuscular (IM) na musculatura epaxial lombar. Induziu-se a anestesia com 3 a 5 Vol % de isoflurano, diluído em 2L/min de oxigênio, via máscara facial e procedeu-se à intubação traqueal guiada por capnografia. Quando a intubação não foi possível, a anestesia foi mantida via máscara facial, o que ocorreu com três dos vinte e oito coelhos.

Durante o procedimento, instituiu-se fluidoterapia com 3 mL/kg/h de Ringer lactato, por meio de acesso venoso com cateter 24G na veia marginal da orelha. Imediatamente antes do início da cirurgia, administrou-se 2 µg/kg de fentanil pela via intravenosa (IV). O procedimento cirúrgico consistiu em ostectomia parcial de 1 cm de extensão na diáfise radial de membro torácico direito, 1,5 cm proximal a articulação radiocárpica. Removeu-se o segmento do rádio juntamente com seu periósteo e procedeu-se à rafia. Uma hora após a recuperação anestésica Administrou-se resgate analgésico a todos os animais com 2 mg/kg de morfina e 1 mg/kg meloxicam IM. A partir de 24 horas após a cirurgia, os animais receberam 5 mg/kg de cloridrato de tramadol IM a cada 8 horas durante três dias.

A monitoração anestésica baseou-se no registro de frequência cardíaca e respiratória, saturação periférica de oxigênio da hemoglobina, fração expirada de CO₂, temperatura retal e pressão arterial sistólica não invasiva por meio de Doppler ultrassônico, registrados a cada cinco minutos.

3.2. Vídeo gravações

Os vinte e oito animais foram filmados utilizando-se uma câmera *GoPro*® nos seguintes momentos:

- *basal*: 24 horas antes da cirurgia
- *dor*: 1h após a recuperação anestésica e antes do resgate analgésico
- *analgesia*: 3 horas após o resgate analgésico
- *24h*: 24 horas após a recuperação anestésica

Para cada um dos quatro momentos descritos, os animais foram filmados por cinco minutos na ausência do observador, mediante acionamento remoto da câmera por aplicativo de celular e a seguir por mais cinco minutos sob a presença da observadora, que se posicionava a em uma cadeira na frente da gaiola e mantinha-se em silêncio.

As 224 filmagens originais (112 na presença da observadora correspondentes às 112 na ausência da observadora) com duração de cinco minutos foram editadas para videoclipes de 2-3 minutos que representassem proporcionalmente os comportamentos observados nos cinco minutos originais.

3.3. Avaliação dos vídeos

As avaliações da RbtGS ocorreram paralelamente às avaliações de uma escala comportamental em desenvolvimento. Três avaliadores (um homem e duas mulheres) encobertos quanto aos momentos de avaliação pontuaram a RbtGS (Figura 1) após assistirem 224 vídeos (112 na presença do observador e 112 na ausência do observador correspondentes aos mesmos coelhos e momentos nas duas avaliações). A pesquisadora principal e autora da tese (RHP) foi responsável pelo manejo dos animais durante as gravações e também pelas edições dos vídeos. As avaliações foram repetidas após um mês para se calcular a confiabilidade intraobservador e nas duas fases os vídeos foram avaliados de forma aleatorizada e cega quanto aos momentos peri-operatórios e a presença ou não do observador.

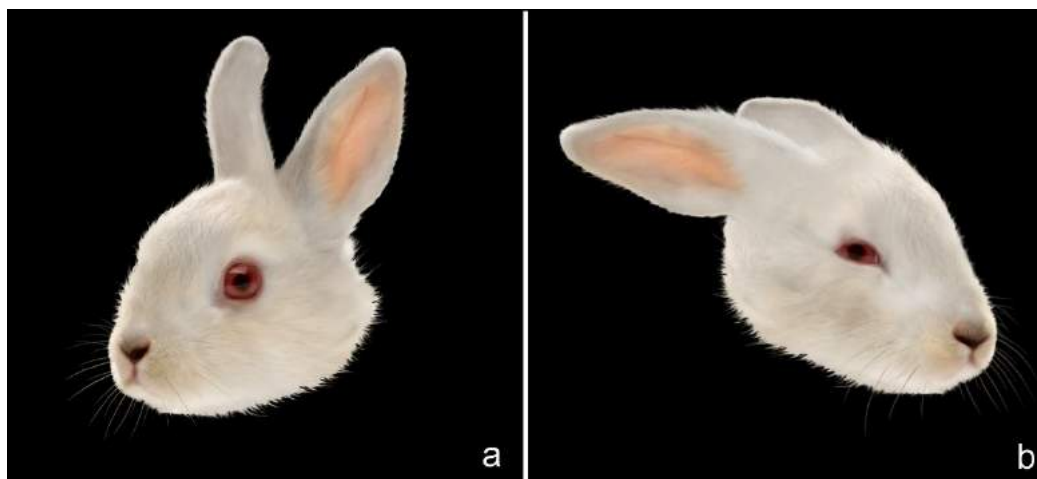


Figura 1: a) expressão facial de um coelho sem dor; b) expressão facial de um coelho com dor (Representação gráfica: Daniel Perez Floriano).

Os avaliadores foram instruídos a pontuar cada item da RbtGS com o maior escore observado durante todo o vídeo e a não pontuar a escala nos momentos em que os coelhos estavam comendo ou se lambendo. Quando o avaliador era incapaz de identificar um dos itens devido à posição do coelho, à baixa qualidade da imagem ou por não visualizar a FAU, deveria incluir um “x” a ser considerado dado perdido nas análises (Figura 2).



Figura 2: Exemplo de escores da RbtGS. As linhas e seta destacam o posicionamento das vibrissas, o formato do nariz e o achatamento das bochechas. a) coelho sem dor; b) coelho com dor.

3.4. Análise estatística

Como critério de exclusão dos dados, quando em um mesmo momento e fase de avaliação (1 ou 2) de um animal, o mesmo avaliador não identificou um dos itens da escala na filmagem sob a presença ou ausência do observador, excluiu-se este mesmo item da avaliação da filmagem na ausência ou presença do observador respectivamente. Os dados identificados por outros avaliadores ou pelo mesmo avaliador durante outra fase de avaliação foram mantidos para a análise estatística.

Calculou-se o escore da RbtGS pela média das FAUS (somaram-se os itens da escala passíveis de avaliação e dividiu-se o valor pelo número de itens avaliados). Desta forma o escore médio da RbtGS variou entre 0-2 (OLIVER et al., 2014).

- **Análise de frequência e dados perdidos**

Foi realizada estatística descritiva de cada um dos escores (0, 1 ou 2) ou dados perdidos de cada FAU em cada um dos momentos de avaliação e em todos os momentos agrupados (MA).

- **Responsividade e interferência do observador**

Os dados foram considerados não normais de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar a responsividade da escala, realizou-se a comparação entre os momentos (*basal, dor, analgesia e 24h*) pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn. Para a comparação entre a presença e ausência do observador

em cada momento, utilizou-se o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

- **Confiabilidade intra e interobservador**

A confiabilidade intra (repetibilidade) e interobservador (reprodutibilidade) para RbtGS foi avaliada pelo coeficiente de correlação intraclass (ICC) modelo *one-way- single*; com intervalo de confiança (CI) de 95%, analisando-se as concordâncias de cada avaliador na fase 1 versus a fase 2 (confiabilidade intraobservador) e as avaliações entre os três avaliadores com os dados agrupados das duas fases (confiabilidade interobservador).

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de ocorrência e dados perdidos

Todos os itens da escala apresentaram escore predominantemente 0 no momento basal. No momento dor e analgesia predominaram os escores 1 ou 2 para os itens aperto orbital e posicionamento das orelhas; escore 0 e dados perdidos para achatamento das bochechas e 63% e mais de 75% de dados perdidos ocorreram para formato do nariz e posição das vibrissas respectivamente. No momento 24h, predominou o escore 0 para todos os itens, exceto posicionamento das orelhas na presença do observador, pontuado como 1 em 50% das avaliações (Figura 3). Das 1344 avaliações totais [28 animais x 2 (presença e ausência do observador) x 4 momentos x 3 avaliadores x 2 fases de avaliação], apenas em 683 (50.8%) foi possível identificar as 5 FAUs.

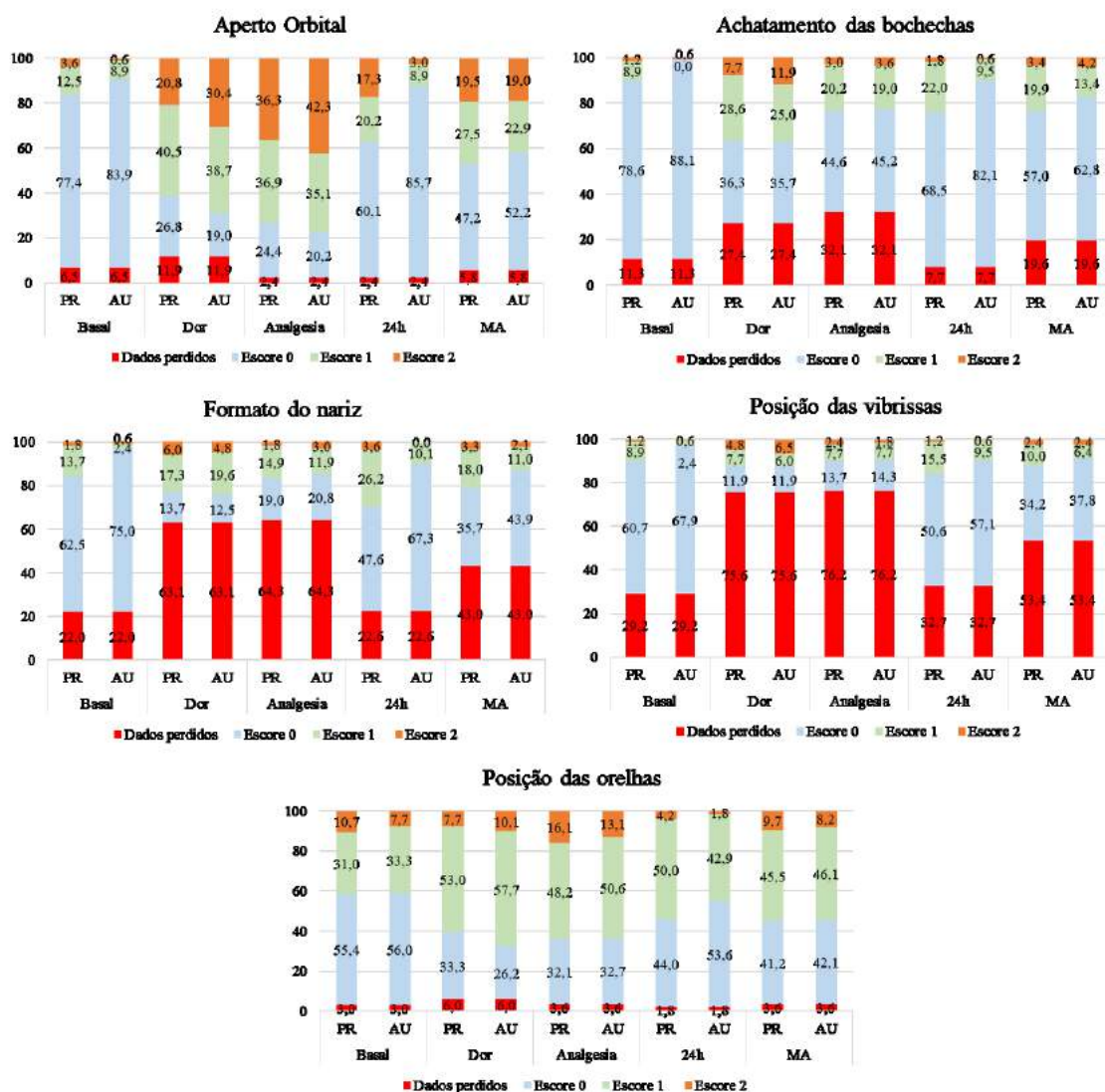


Figura 3: Gráficos de frequência de ocorrência dos escores de cada item e dados perdidos da RbtGS. *Basal* - 24 horas antes da cirurgia; *dor* - 1 hora após a recuperação anestésica; *analgesia* - 3 horas após o resgate analgésico; *24h* - 24 horas após a recuperação anestésica; GM – momentos agrupados (*basal + dor + analgesia + 24h*); PR – presença do observador; AU – ausência do observador.

4.2 Responsividade e influência da presença do observador

Tanto na ausência como na presença do observador, a RbtGS demonstrou responsividade, apresentando maiores escores no momento *dor* (presença: 0,75; 0-1,75, ausência:1; 0-2) em comparação ao *basal* (presença: 0,75; 0-1,75, ausência:1; 0-2) em comparação ao *basal* (presença: 0,2; 0-2, ausência:0; 0-2). Não houve diferença estatística entre os momentos *dor* e *analgesia*. Apenas na presença do observador, os escores às 24h foram maiores que no basal (Figura 4).

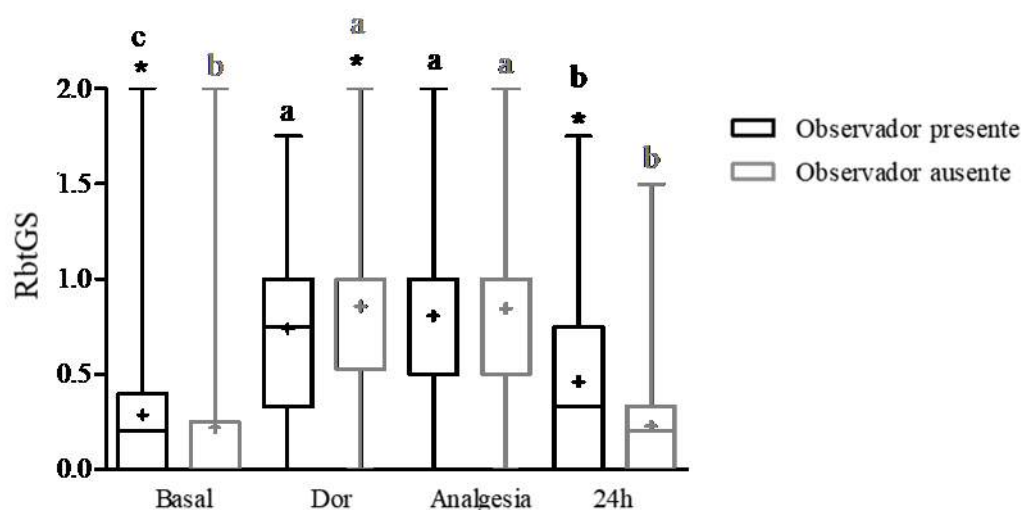


Figura 4. Gráfico de caixas da responsividade da RbtGS. *Basal* - 24 horas antes da cirurgia; *dor* - 1 hora após a recuperação anestésica; *analgesia* - 3 horas após o resgate analgésico; *24h* - 24 horas após a recuperação anestésica. Letras pretas indicam semelhança ou diferença entre os momentos na presença do avaliador; letras cinzas indicam semelhança ou diferença entre os momentos na ausência do observador; a>b>c; * indica diferença estatística entre a presença e ausência do observador.

No *basal* e *24h*, os escores foram maiores na presença do que na ausência do observador. No momento *dor*, os escores foram maiores na ausência do observador. Não se observaram diferenças entre a presença e ausência do observador no momento *analgesia* (Figura 4).

4.3. Confiabilidade

A RbtGS apresentou confiabilidade intraobservador de boa (0,69) a muito boa (0,82) (Tabela 1) e confiabilidade interobservador de moderada (0,49) a boa (0,67) (Tabela 2) (ALTMAN, 1991).

Tabela 1: Confiabilidade intraobservador da RbtGS.

Intraobservador	ICC (CI)
Avaliador 1	0,76 (0,71-0,82)
Avaliador 2	0,77 (0,71-0,82)
Avaliador 3	0,75 (0,69-0,80)

ICC: coeficiente de correlação intraclass; CI: intervalo de confiança de 95%. Interpretação: muito bom 0,81–1,0; bom: 0,61–0,80; moderada: 0,41–0,60; razoável: 0,21–0,4; baixa < 0,2 (ALTMAN, 1991).

Tabela 2: Confiabilidade interobservador da RbtGS.

Interobservador	ICC (CI)
Avaliador 1 x 2	0,61 (0,55-0,66)
Avaliador 1 x 3	0,55 (0,49-0,61)
Avaliador 2 x 3	0,61 (0,55-0,67)

ICC: coeficiente de correlação intraclass; CI: intervalo de confiança de 95%. Interpretação: muito bom 0,81–1,0; bom: 0,61–0,80; moderada: 0,41–0,60; razoável: 0,21–0,4; baixa < 0,2 (ALTMAN, 1991).

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados corroboram os do etograma de coelhos submetidos à cirurgia ortopédica (PINHO et al., 2020), ao se observar a responsividade da RbtGS frente a dor e que o observador presente inibiu os comportamentos indicativos de dor em coelhos com dor e a expressão do comportamento normal em coelhos desprovidos de dor, podendo levar a resultados falso negativos ou positivos respectivamente.

Tanto sob a presença como na ausência do observador, todos os itens da escala apresentaram predominantemente escore “0” no momento *basal*. Já os escores 1 ou 2, correspondentes a presença moderada ou óbvia da FAU no momento de maior dor pós-operatória, foram observados para os itens aperto orbital e posição das orelhas. Já os demais itens apresentaram dados perdidos em grande parte das avaliações nos momentos *dor* e *analgesia*. A representativa parcela de dados perdidos tais FAUs pode ter subestimado a presença dos escores 1 e 2 no momento *dor*. No momento *24h* o escore 0 predominou para todas as FAUs com exceção da posição das orelhas, em que houve grande quantidade de escore 1 tanto na presença como na ausência do observador, provavelmente em decorrência ao acesso venoso instituído na veia marginal da orelha durante a anestesia. Sugere-se que ao se avaliar coelhos pela escala facial, realize-se a cateterização venosa em outras regiões quando possível, como por exemplo a veia cefálica.

Aparentemente a avaliação remota das expressões facial em coelhos por imagens fotográficas (KEATING et al., 2012; HEDENQVIST et al., 2016) ou vídeos (presente estudo), dada a dificuldade de se obter imagens de qualidade

suficiente, influencia na identificação das FAUs, visto que quando avaliadas presencialmente (BANCHI et al., 2020), não se relatou a dificuldade em identificá-las. Outra possível justificativa para os dados perdidos nos momentos *dor* e *analgesia* é a posição dos coelhos durante estes momentos, em que estes se posicionavam com o rosto voltado para o fundo da gaiola, algumas vezes distantes da câmera, o que reduziu a qualidade da imagem facial. Durante o próprio desenvolvimento da RbtGS (KEATING et al., 2012), mesmo realizando-se o registro das imagens com uma câmera de alta resolução à uma curta distância da face dos coelhos, excluiu-se o item posição das vibrissas das análises pois não se identificou esta FAU na maior parte das imagens devido à qualidade insuficiente das fotos. Ao se avaliar a RbtGS por registro fotográfico em coelhos submetidos à cirurgia maxilar (HEDENQVIST et al., 2016), também não se detectou adequadamente o formato do nariz e o achatamento das bochechas em nenhum momento e foi difícil avaliar o posicionamento das vibrissas, o que fez com que se excluísse estes itens da análise estatística, mantendo-se apenas os itens aperto orbital e posicionamento das orelhas, que são itens presentes em todas as escalas faciais (EVANGELISTA; MONTEIRO; STEAGALL, 2021) e possivelmente os de mais fácil avaliação. Tais achados corroboram nossos resultados.

A impossibilidade em identificar itens de escala faciais para avaliar a dor é relatada frequentemente. Em outras espécies excluíram o item vibrissas devido à dificuldade de identificação em camundongos (LEACH et al., 2012; MILLER et al., 2015) e por ser estatisticamente pouco representativo em ferrets (REIJGWART et al., 2017). Em leitões (DI GIMINIANI et al., 2016), excluíram-se os itens contração do lábio, dilatação das narinas e perfil da mandíbulas pela

dificuldade na identificação. Tais achados sugerem que ao desenvolver-se um ponto de corte para a RbtGS, ou até mesmo outras escalas faciais, se determinem pontos de corte adicionais para quando não for possível a identificação de cada FAU.

A RbtGS apresentou responsividade, dada pelo aumento dos escores após a cirurgia e redução após 24 horas. Todavia, tanto na presença como na ausência do observador, não houve responsividade em resposta à analgesia, assim como observado nas alterações comportamentais (PINHO et al., 2020). Tal achado pode ter ocorrido devido à falta de efetividade dos analgésicos empregados ou influência dos opioides nas expressões faciais. Ao menos na escala comportamental em estudo concomitante, com os mesmos protocolos anestésicos, analgésicos e cirúrgicos nos mesmos coelhos (não publicado), o protocolo analgésico foi suficiente para reduzir significativamente os escores de dor em coelhos, desta forma esta hipótese não nos parece plausível. Já quanto aos opioides, na escala para avaliar a sedação em coelhos (RAULIC et al., 2021) consta o item aperto orbital, o que pode reforçar a hipótese de influência da ação do opioide no momento analgesia. Para equinos, FAUs relacionadas aos olhos podem ser distinguidas entre as que são causadas pelo relaxamento da sedação, denominada fechamento orbital e a FAU relacionada à contração muscular facial causada pela dor, denominada aperto orbital (DALLA COSTA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2021), entretanto, tal diferenciação não parece ser possível em coelhos, possivelmente pelo tamanho reduzido dos animais e pela pelagem densa, já que a FAU aperto orbital é descrita de forma idêntica na escala de sedação (RAULIC et al., 2021) e na escala facial para avaliar a dor (KEATING et al., 2012). Em gatos avaliados presencialmente, observou-se maior

escore do aperto orbital após a administração de buprenorfina e acepromazina em comparação ao basal, embora tal diferença não tenha influenciado a somatória da escala (EVANGELISTA et al., 2020). Apenas em camundongos da linhagem DBA/2, o isoflurano, mas não a buprenorfina, aumentou os escores totais da escala facial (MILLER et al., 2015). A exposição por 12 minutos ao isoflurano em ratos, mas não por 4 minutos, aumentou os escores da RGS (MILLER; GOLLEDGE; LEACH, 2016).

Semelhante ao relatado no estudo que desenvolveu o etograma de coelhos submetidos à cirurgia ortopédica (PINHO et al., 2020), com a presença do observador humano mulher e mesmo que familiar aos coelhos, subestimou-se os escores de dor no momento de maior dor (*dor*) e superestimou-se a dor nos momentos que os animais estariam desprovidos de dor (*basal* e *24h*). Tais resultados refletem a possibilidade de tanto as alterações comportamentais como as faciais representarem outras emoções além da dor, como por exemplo o medo (DOLENSEK et al., 2020), o que levaria a resultados falsos positivos, ou seja, identificar a dor quando ela não está presente. Todavia, apesar das diferenças observadas entre presença e ausência do observador nos comportamentos e nas expressões faciais no presente estudo, foi possível reconhecer a dor pelos dois métodos mesmo que na presença do observador: houve redução na duração de comportamentos normais como por exemplo ativo, explorar e mudança na postura após a cirurgia (PINHO et al., 2020) e houve aumento dos escores da RbtGS no presente estudo tanto na presença como na ausência do observador. Em camundongos e ratos expostos a dor por injeção de substância inflamatória, a presença de observadores humanos homens, mas não mulheres, reduziu os escores da MGS e da RGS respectivamente (SORGE

et al., 2014). Em ratos, uma observadora mulher pouco afetou os escores da RGS 24h após o estímulo doloroso e apenas em um grupo tratado com buprenorfina, daí não ter se considerado importante (LEUNG; ZHANG; PANG, 2016).

Este foi o primeiro estudo que avaliou a confiabilidade intraobservador da RbtGS, considerada boa. Já a confiabilidade interobservador foi inferior à dos estudos prévios da RbtGS em coelhos avaliados por fotografias (KEATING et al., 2012) ou presencialmente (BANCHI et al., 2020) e inferior à escala composta para avaliar e quantificar a dor em coelhos (CANCERS) (BANCHI et al., 2020). Apesar de no presente estudo os avaliadores receberem os descritores e fotografias com exemplos de cada item da escala, não houve treinamento, que poderia melhorar a confiabilidade do instrumento, como descrito em ratos para a RGS (ZHANG; LEUNG; PANG, 2019).

Pode-se imputar algumas limitações à este estudo. Tanto a quantidade de dados perdidos como a confiabilidade podem ter sido prejudicadas pela avaliação por meio de vídeos. Considerando-se que os vídeos duravam entre 2 e 3 minutos, foi impossível padronizar entre os avaliadores o exato momento que se pontuou os escores, o que não ocorre para avaliação fotográfica que é estática e mesmo para a avaliação presencial que requer um tempo mais curto. A qualidade insuficiente da captação da imagem nos vídeos tem impacto direto na avaliação das escalas faciais (KEATING et al., 2012; DALLA COSTA et al., 2014; MCLENNAN et al., 2016) e sua melhoria resultou em avaliações com maior acurácia (LANGFORD et al., 2010). A presença das grades da gaiola nos vídeos em sobreposição a face também pode ter dificultado a avaliação das FAUs, sendo recomendado para futuros estudos alojamentos que possibilitem a

visualização da face de diferentes ângulos. A avaliação por vídeo é a metodologia consagrada para validar escalas comportamentais de dor (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; TAFFAREL et al., 2015; LUNA et al., 2020; SILVA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021) pois se assemelha à avaliação presencial, além de possibilitar a reavaliação das imagens, aspecto importante para determinar a confiabilidade intraobservador. A redução dos vídeos para vídeos menores também é uma limitação, pois as FAUs observadas neste período podem não refletir o que seria observado no vídeo original.

Já o método padrão para desenvolver e validar as escalas faciais é por fotografias ou recortes de vídeos, que ao prover alta qualidade e fixação da imagem possibilitam identificar as FAUS em um mesmo instante e estado do animal por diferentes avaliadores (LANGFORD et al., 2010; SOTOCINAL et al., 2011; KEATING et al., 2012; DI GIMINIANI et al., 2016; MCLENNAN et al., 2016; REIJGWART et al., 2017; EVANGELISTA et al., 2019). Todavia, o uso de fotografias pode não refletir a avaliação presencial, visto que 1) o animal em movimento pode dificultar sua avaliação da expressão facial; 2) dentro de um período de tempo as expressões podem variar e 3) a fotografia pode captar uma expressão com duração ínfima que possivelmente não seria visualizada durante a avaliação presencial. Em humanos, observar a alteração do padrão de expressões faciais favorece diferenciar emoções como o medo e a surpresa, mas tal reconhecimento não é efetivo durante avaliações estáticas (WEHRLE et al., 2000). Em equinos, alterações de expressões faciais no lábio superior foram de difícil avaliação por fotografias, mas facilmente reconhecidas em vídeos (WATHAN et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

A RbtGS apresentou responsividade, repetibilidade e reprodutibilidade na avaliação por vídeo filmagens em coelhos submetidos à cirurgia ortopédica. Na presença da observadora humana familiar aos coelhos, subestimou-se os escores de dor no momento de maior dor e superestimou-se a dor nos momentos de pouca ou nenhuma dor. O número significativo de dados perdidos é uma limitação importante da RbtGS ao se avaliar coelhos sem manipulá-los. Este estudo pode contribuir na melhora do bem-estar de coelhos de laboratório ao estudar uma ferramenta empregada na avaliação da dor.

7. REFERÊNCIAS

ALTMAN, D. G. Practical statistics for medical research, **London: Chapman & Hall**; 1991.

BANCHI, P. et al. Reliability and Construct Validity of a Composite Pain Scale for Rabbit (CANCRS) in a Clinical Environment. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221377>>.

BRONDANI, J. T. et al. Validation of the English Version of the UNESP-Botucatu Multidimensional Composite Pain Scale for Assessing Postoperative Pain in Cats. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 2013.

BURCH, W. M. S. R. and R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. [s.l.: s.n.]

DALLA COSTA, E. et al. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92281, 19 Mar. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092281>>.

DARWIN, C. The Expression of the Emotions in Man and Animals. **London: Abermale**, v. 2, p. 444, 1872. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2841467?origin=crossref>>.

DE OLIVEIRA, A. R. et al. Development and Validation of the Facial Scale (FaceSed) to Evaluate Sedation in Horses. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June, p. 1–25, 2021.

DE OLIVEIRA, F. A. et al. Validation of the UNESP-Botucatu Unidimensional Composite Pain Scale for Assessing Postoperative Pain in Cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 200, 6 Dec. 2014. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-014-0200-0>>.

DESCOVICH, K. A. et al. Facial Expression: An under-Utilized Tool for the Assessment of Welfare in Mammals. **Altex**, v. 34, n. 3, p. 409–429, 2017.

DI GIMINIANI, P. et al. The Assessment of Facial Expressions in Piglets Undergoing Tail Docking and Castration: Toward the Development of the Piglet Grimace Scale. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. NOV, p. 1–10, 2016.

DIVINCENTI, L.; MEIRELLES, L. A. D.; WESTCOTT, R. A. Safety and Clinical Effectiveness of a Compounded Sustained-Release Formulation of Buprenorphine for Postoperative Analgesia in New Zealand White Rabbits. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 7, p. 795–801, 2016.

DOLENSEK, N. et al. Facial Expressions of Emotion States and Their Neuronal Correlates in Mice. **Science**, v. 368, n. 6486, p. 89–94, 2020.

EVANGELISTA, M. C. et al. Facial Expressions of Pain in Cats: The Development and Validation of a Feline Grimace Scale. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19128, 13 Dec. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S146729871830120X>>.

EVANGELISTA, M. C. et al. Clinical Applicability of the Feline Grimace Scale: Real-Time versus Image Scoring and the Influence of Sedation and Surgery. **PeerJ**, v. 2020, n. 4, p. 1–17, 2020.

EVANGELISTA, M. C.; MONTEIRO, B. P.; STEAGALL, P. V. Measurement Properties of Grimace Scales for Pain Assessment in Nonhuman Mammals. **Pain**, v. Publish Ah, n. 00, 9 Sep. 2021. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1097/j.pain.0000000000002474>>.

GLEERUP, K. B. et al. Pain Evaluation in Dairy Cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 25–32, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.023>>.

GRUNAU, R. V. E.; CRAIG, K. D. Pain Expression in Neonates: Facial Action and Cry. **Pain**, v. 28, n. 3, p. 395–410, 1987.

GUESGEN, M. J. et al. Coding and Quantification of a Facial Expression for Pain in Lambs. **Behavioural Processes**, v. 132, p. 49–56, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2016.09.010>>.

HÄGER, C. et al. The Sheep Grimace Scale as an Indicator of Post-Operative Distress and Pain in Laboratory Sheep. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2017.

HEDENQVIST, P. et al. Carprofen Neither Reduces Postoperative Facial Expression Scores in Rabbits Treated with Buprenorphine nor Alters Long Term Bone Formation after Maxillary Sinus Grafting. **Research in Veterinary Science**, v. 107, p. 123–131, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.05.010>>.

KEATING, S. C. J. et al. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2012.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of Facial Expressions of Pain in the Laboratory Mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, 9 Jun. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmeth.1455>>.

LEACH, M. C. et al. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. **PloS one**, 2012.

LEUNG, V.; ZHANG, E.; PANG, D. S. J. Real-Time Application of the Rat Grimace Scale as a Welfare Refinement in Laboratory Rats. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–12, 2016.

LUNA, S. P. L. et al. Validation of the UNESP-Botucatu Pig Composite Acute Pain Scale (UPAPS). **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, p. 1–27, 2020.

MCLENNAN, K. M. et al. Development of a Facial Expression Scale Using Footrot and Mastitis as Models of Pain in Sheep. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 176, p. 19–26, Mar. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159116000101>>.

MILLER, A. et al. The Effect of Isoflurane Anaesthesia and Buprenorphine on the Mouse Grimace Scale and Behaviour in CBA and DBA/2 Mice. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 172, p. 58–62, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.038>>.

MILLER, A. L.; GOLLEDGE, H. D. R.; LEACH, M. C. The Influence of Isoflurane Anaesthesia on The Rat Grimace Scale. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–8, 2016.

OLIVEIRA, M. G. C. de et al. Validation of the Donkey Pain Scale (DOPS) for Assessing Postoperative Pain in Donkeys. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. June, p. 1–15, 2021.

OLIVER, V. et al. Psychometric Assessment of the Rat Grimace Scale and Development of an Analgesic Intervention Score. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

OOSTERMAN, J. M. et al. The Use of Facial Expressions for Pain Assessment Purposes in Dementia: A Narrative Review. **Neurodegenerative disease management**, v. 6, n. 2, p. 119–131, 2016.

PINHO, R. H. et al. Postoperative Pain Behaviours in Rabbits Following Orthopaedic Surgery and Effect of Observer Presence. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0240605, 22 Oct. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0240605>>.

RAILLARD, M. et al. Anaesthetic and Perioperative Management of 14 Male New Zealand White Rabbits for Calvarial Bone Surgery. **Animals**, v. 9, n. 11, 2019.

RAULIC, J. et al. Development and Testing of a Sedation Scale for Use in Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*) . **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 60, n. 5, p. 549–555, 2021.

REIJGWARD, M. L. et al. The Composition and Initial Evaluation of a Grimace Scale in Ferrets after Surgical Implantation of a Telemetry Probe. **PLoS ONE**, 2017.

SILVA, N. E. O. F. et al. Validation of the Unesp-Botucatu Composite Scale to Assess Acute Postoperative Abdominal Pain in Sheep (USAPS). **PloS one**, v. 15, n. 10, p. e0239622, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0239622>>.

SORGE, R. E. et al. Olfactory Exposure to Males, Including Men, Causes Stress and Related Analgesia in Rodents. **Nature Methods**, v. 11, n. 6, p. 629–632, 2014.

SOTOCINAL, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, 2011.

TAFFAREL, M. O. et al. Refinement and Partial Validation of the UNESP-Botucatu Multidimensional Composite Pain Scale for Assessing Postoperative Pain in Horses. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.

WATHAN, J. et al. EquiFACS: The Equine Facial Action Coding System. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–35, 2015.

WEHRLE, T. et al. Studying the Dynamics of Emotional Expression Using Synthesized Facial Muscle Movements. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 78, n. 1, p. 105–119, 2000.

ZHANG, E. Q.; LEUNG, V. S. Y.; PANG, D. S. J. Influence of Rater Training on Inter- And Intrarater Reliability When Using the Rat Grimace Scale. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 58, n. 2, p. 178–183, 2019.