



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

Renata Haddad Pinho

**Desenvolvimento, validação e confiabilidade de uma escala
para avaliar a dor aguda em coelhos (*Oryctolagus
cuniculus*).**

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

Orientador: Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

**Botucatu
2020**

Renata Haddad Pinho

Desenvolvimento, validação e confiabilidade de uma
escala para avaliar a dor aguda em coelhos
(*Oryctolagus cuniculus*).

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

Orientador: Prof.Titular Dr.Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pinho, Renata Haddad.

Desenvolvimento, validação e confiabilidade de uma escala
para avaliar a dor aguda em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)
/ Renata Haddad Pinho. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Stelio Pacca Loureiro Luna
Capes: 50501011

1. Medição da dor. 2. Animais de laboratório. 3. Bem-estar.
4. Reprodutibilidade dos testes. 5. Coelho.

Palavras-chave: animais de laboratório; avaliação da dor;
bem-estar; confiabilidade; leporinos.

“Aos animais de experimentação, cujo bem-estar e alívio da dor foram as grandes motivações para o desenvolvimento deste estudo.”

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e compreensão desde a graduação.

À Shakira, minha grande companheira, por me lembrar todos os dias desde os tempos de “caloura” que privilégio é poder aliviar a dor de seres tão amáveis e sensíveis como os animais.

À minha família de Botucatu, meus colegas de trabalho e amigos, obrigada por tornarem minha trajetória mais tranquila e prazerosa.

À Daniela, Mariana e André pelo carinho e seriedade com que se envolveram no meu trabalho.

Ao Pedro e à Alice pela amizade, pelos ensinamentos e pela parceria. A amizade de vocês foi um grande presente da pós-graduação!

À Fabiana e aos amigos de Jaboticabal Pão, Dália, Lari, Pauline, Gabi e Tamy pelo suporte durante o desenvolvimento do projeto.

Ao professor Bruno Minto da Unesp de Jaboticabal e à sua equipe pela parceria.

Ao professor Matthew Leach da Universidade de Newcastle pela contribuição ao nosso projeto.

À Natache pela amizade e pelo exemplo profissional desde a residência. Levo um pouco dela em cada uma das minhas anestésias.

Aos funcionários da pós-graduação, sempre dispostos a nos ajudar, em especial à Tati e à Márcia por todo carinho e paciência.

Ao Diego, pela colaboração na validação de conteúdo da escala.

Aos membros da banca da qualificação e da defesa, Dra. Natache, Professora Sílvia, Professor Francisco e Dra. Daniela pela disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelos 10 meses de bolsa - Código de financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro na forma de Bolsa de Estudo no País processo nº 2018/17839-7 e Projeto Temático nº 2017/12815-0.

Ao professor Stelio, querido orientador, por todo incentivo ao meu crescimento profissional, pela chance de fazer parte de um time incrível, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de desenvolver um projeto tão gratificante.

RESUMO

PINHO, R.H. **Desenvolvimento, validação e confiabilidade de uma escala para avaliar a dor aguda em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

Considerando-se a ampla utilização de coelhos em pesquisas que potencialmente causam dor e desconforto, a negligência no tratamento da dor e a ausência de ferramentas capazes de avaliar adequadamente a dor nesta espécie, o presente estudo objetivou desenvolver e validar uma escala de dor aguda pós-operatória em coelhos (RPBS). Cinquenta e oito coelhos foram filmados durante estudos prévios dos quais 28 foram submetidos à ostectomia parcial de rádio, 14 à ovariossalpingohisterectomia (OSH) e 16 à orquiectomia. As filmagens ocorreram nos momentos: basal (antes da cirurgia); dor (momento de maior dor esperada, após a cirurgia); analgesia (após o resgate analgésico – apenas para os animais submetidos à cirurgia ortopédica) e 24h (24 horas após a cirurgia). Elaborou-se a RPBS com base em comportamentos identificados pelo etograma dos animais submetidos à cirurgia ortopédica e descritos na literatura para coelhas submetidas à OSH. Os comportamentos foram avaliados por um comitê de especialistas (avaliação de conteúdo) e a seguir procedeu-se à avaliação dos vídeos por quatro observadores encobertos quanto aos momentos, que respondiam, após a observação dos vídeos, se eles indicariam resgate analgésico, pontuavam a RPBS e as escalas numérica (EN), descritiva simples (EDS) e analógica visual (EAV). Um mês após a primeira avaliação, os vídeos foram novamente aleatorizados e reavaliados. Após as avaliações, a escala foi refinada e validada. A RPBS foi considerada unidimensional por conter auto-valor e variância aceitáveis apenas na primeira dimensão pela análise de componentes principais. A confiabilidade intra e interobservador para a somatória da escala (ICC) foi muito boa ($>0,80$) para todos os avaliadores. A escala foi responsiva quando se comparou o momento basal ao momento dor, embora sua somatória não tenha apresentado diferença entre os momentos dor e analgesia. Por meio da correlação de Spearman, observou-se alta correlação da RPBS com a EN (0,86), EDS (0,84) e EAV (0,84) e correlação item-total adequada ($>0,3$). A consistência interna foi considerada excelente (coeficiente α de Cronbach $>0,80$). Determinou-se a pontuação ≥ 3 da somatória da escala como ponto de resgate analgésico (Youden index), com

área sob a curva $>0,90$ para todos os avaliadores, o que evidencia alta capacidade discriminatória da RPBS. As pontuações 2, 3 e 4 se apresentaram dentro da zona de incerteza diagnóstica. Classificou-se os escores como dor de baixa intensidade (1 a 4); intensidade intermediária (5 e 6) e intensidade alta (≥ 7). Concluiu-se que a escala proposta apresenta validade de conteúdo, critério e constructo, responsividade e confiabilidade para avaliar dor aguda em coelhos submetidos a cirurgias de tecidos moles e ortopédicas. O ponto de corte e a classificação das pontuações servem como balisamento para a administração de analgésicos a coelhos submetidos a procedimentos dolorosos.

Palavras-chave: avaliação da dor, animais de laboratório, bem-estar, confiabilidade, leporinos, validade.

PINHO, R.H. **Development, validation and reliability of a pain scale for assessing postoperative pain in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)**. 93p. Dissertation (MSc) – School of Medicine, São Paulo State University, Botucatu, 2020.

ABSTRACT

Considering the widespread use of rabbits in research that potentially causes pain and discomfort, neglect in the treatment of pain in laboratory animals and the absence of tools capable of adequately assessing pain in this species, the present study aimed to develop and validate a scale of acute postoperative pain in rabbits (RPBS). Footages from three previous studies were used, in which 58 rabbits were submitted to orchiectomy, ovariectomy (OVH) or partial radial ostectomy, recorded at baseline (before surgery); pain (moment of greatest expected pain, after surgery); analgesia (after analgesic rescue - only for animals submitted to orthopedic surgery) and 24h post (24 hours after surgery). The RPBS was developed based on behaviours identified by the ethogram of animals submitted to orthopedic surgery and described in the literature for rabbits undergoing OVH. The behaviours were evaluated by a committee of experts (content evaluation) and then the videos were evaluated by four blinded observers who answered if there was a need for analgesic rescue and scored the proposed scale, as well as the numerical rating (NRS), the simple descriptive (SDS) and the visual analogue scales (VAS). One month after the first evaluation, the videos were again randomized and reassessed. After the evaluations, the scale was refined and validated. According to the principal component analysis, the RPBS was considered unidimensional as it contained adequate eigen-value and variance only in the first dimension. The intra- and inter-observer reliability for the sum of the scale (ICC) was excellent (> 0.80) for all evaluators. According to the Friedman test, the scale was responsive, yet its sum did not reveal any difference between the pain and analgesia moments. By means of the Spearman's correlation, there was a high correlation of RPBS with NRS (0.86), SDS (0.84) and VAS (0.84), and adequate item-total correlation (> 0.3). The internal consistency was considered excellent (Cronbach's α coefficient > 0.80). The score ≥ 3 was the cut-off for rescue analgesia with an area under the curve > 0.90 for all evaluators, demonstrating a high discriminatory capacity of such instrument. Scores 2, 3 and 4 were in the gray zone of diagnostic. Scores were classified as low-intensity pain (1 to 4), intermediate intensity (5 and 6) and high

intensity (≥ 7). It was concluded that the proposed scale presented content, criterion and construct validities, responsiveness and reliability to assess acute pain in rabbits. The cut-off for rescue analgesia and the classification of the scores serve as a basis for the administration of analgesics to rabbits submitted to painful procedures.

Keywords: animal welfare, laboratory animals, lagomorph, pain assessment, reliability, validity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama das filmagens utilizadas para elaborar o etograma e filmagens para avaliar a escala no período perioperatório de coelhos submetidos à cirurgia ortopédica.....	28
Figura 2 - Escalas utilizadas para avaliação da dor. 1 – EN, com escore 1 (sem dor) a 10 (pior dor possível); 2 - EDS com quatro níveis descritivos; 3 – EAV com escore 0mm (sem dor) à 100mm (pior dor possível).....	33
Figura 3 – Biplot da análise de componentes principais com os itens da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).....	44
Figura 4 - Distribuição em porcentagem dos escores (0, 1 ou 2) de cada item da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).....	46
Figura 5 - Correlação dos postos de Spearman entre somatória total da escala comportamental para avaliar a dor em coelhos (RPBS) com as escalas unidimensionais.....	50
Figura 6 - Gráfico de caixas da somatória total da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) dos grupos ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox agrupados.....	51
Figura 7 - Gráfico de caixas da somatória total da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) do grupo ORTO.....	51
Figura 8 - Curva ROC, área sob a curva e zona de incerteza diagnóstica para todos os avaliadores agrupados.....	57
Figura 9 – Dendograma criado pela análise de agrupamento não hierárquica de acordo com a somatória total da RPBS.....	60
Figura 10 – Gráfico de caixas para as três intensidades de dor (low, intermediate e high).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição dos cinco grupos experimentais com base nos três estudos prévios envolvidos neste trabalho	24
Tabela 2 - Definição dos momentos de filmagem avaliados nos 5 grupos.	27
Tabela 3 - Descrição das análises e testes estatísticos para o refinamento e validação da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).	35
Tabela 4 – Versão final da escala comportamental para avaliar a dor aguda pós-operatória em coelhos (RPBS) após o refinamento.	42
Tabela 5 – Valores de carga de cada item da escala comportamental para avaliar a dor aguda pós-operatória em coelhos (RPBS) baseada na análise de componentes principais.	44
Tabela 6 – Confiabilidade intraobservador (repetibilidade) da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS), da indicação de resgate analgésico e das escalas unidimensionais de acordo com os coeficientes kappa ponderado (kw) e de correlação intraclasse (ICC).	47
Tabela 7 - Coerência para recomendação de resgate analgésico nos momentos basal e de dor	48
Tabela 8 - Confiabilidade interobservador (reprodutibilidade) da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS), da indicação de resgate analgésico e das escalas unidimensionais de acordo com os coeficientes kappa ponderado (kw) e de correlação intraclasse (ICC).	49
Tabela 9 – Matriz de confiabilidade entre todos os observadores referente a somatória da escala comportamental para avaliar a dor em coelhos (RPBS) de acordo com o coeficiente de correlação intraclasse (ICC).	49
Tabela 10 – Responsividade de cada um dos itens, da somatória da RPBS, das escalas EN, EDS, EAV e recomendação para resgate analgésico [mediana (amplitude)] para os grupos ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox agrupadamente.	52
Tabela 11 - Responsividade de cada um dos itens, da somatória da RPBS, das escalas EN, EDS, EAV e recomendação para resgate analgésico [mediana (amplitude)] para o grupo ORTO isoladamente.	53
Tabela 12 - Correlação item-total (coeficiente de correlação de postos de spearman - rs) e consistência interna (α de Crombach) da escala comportamental para avaliar dor aguda em coelhos (RPBS).	54
Tabela 13 - Especificidade e sensibilidade em porcentagem de cada item da escala comportamental para avaliar a dor em coelhos (RPBS) em coelhos submetidos à cirurgias ortopédicas e tecidos moles agrupados.	55
Tabela 14 - Especificidade e sensibilidade em porcentagem de cada item da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) em cada um dos grupos isoladamente	56

Tabela 15 – A) Especificidade, sensibilidade e índice de Youden de cada avaliador e todos os avaliadores juntos para cada escore da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS); B) Intervalos de confiança (IC) de 95% do índice de 1.001 reamostragens e sensibilidade e especificidade > 90% para estimar a zona de incerteza diagnóstica do ponto de corte de cada avaliador e todos os avaliadores juntos de acordo com o índice de Youden.	58
Tabela 16 - Frequência e porcentagem de animais pontuados na zona de incerteza diagnóstica de acordo com a escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).	59
Tabela 17 – Distribuição da frequência e porcentagem do número de animais em cada intensidade da dor.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3R'S – reduzir, substituir e refinar (*replace, reduce and refinement*)
ASC – área sob a curva
CANCERs – Escala composta multidimensional para avaliar e quantificar a dor em coelhos
cm – centímetro
cm³ – centímetro cúbico
CO₂ – gás carbônico
COE – coerência
E – especificidade
EAV – escala analógica visual
EDS – escala descritiva simples
EN – escala numérica
et al – colaboradores
h – hora
IC – intervalo de confiança
ICC – coeficiente de correlação intraclasse
IM – intramuscular
IV – intravenosa
IY – índice de youden
Kg – quilograma
K_w – grau de confiabilidade kappa
L – litro
MA – todos os momentos agrupados
mg – miligrama
µg – micrograma
min – minuto
ml – mililitro
mm – milímetro
N/A – não aplicável
°C – graus celcius
O₂ – oxigênio
ORQ – orquiectomia
ORTO – ortopedia
OSH – ovariossalpingohisterectomia
R – refinamento
RbtGs – escala de dor baseada nas expressões faciais de coelhos (*Rabbit Grimace Scale*)
ROC – Curva Característica de Operação do Receptor
RPBS – Escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (*Rabbit pain behaviour scale*)
r_s – coeficiente de correlação de Spearman
S – sensibilidade
SC – subcutânea
V – validação
VO – via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alfa
= – igual
< – menor
 $\leq$ – menor ou igual
> – maior
 $\geq$ – maior ou igual
 $\pm$ – mais ou menos
% – porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Negligência na avaliação e tratamento da dor em coelhos</i>	18
2.2 <i>Métodos de avaliação da dor em coelhos</i>	19
2.3 <i>Processo de validação de escalas</i>	21
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Animais e delineamento experimental	25
4.1.1 Animais submetidos à cirurgia ortopédica - Grupo Orto	25
4.1.2 Animais submetidos à ovariosalpingohisterectomia - Grupos OSH-Pla e OSH-Melox	29
4.1.3 Animais submetidos à orquiectomia – Grupos ORQ-Melox e ORQ-Multi	29
4.2 Seleção dos comportamentos e elaboração da escala	31
4.3 Avaliação dos vídeos	31
4.4 Seleção e treinamento de avaliadores	31
4.5 Avaliação oficial	32
4.6 Análise Estatística	33
4.6.1 Seleção de comportamentos (grupo ORTO) para a escala	33
4.6.2 Refinamento e validação da escala	34
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	80

1. INTRODUÇÃO

Coelhos e roedores são ampla e mundialmente empregados como modelos experimentais em pesquisa (GREAT BRITAIN et al., 2019), sendo frequentemente submetidos à dor em procedimentos experimentais. O princípio dos 3R's de Russel & Burch (*reduce, replace and refine*) - reduzir, substituir e refinar – norteia a legislação mundial referente ao uso de animais em experimentos. Especificamente o princípio do refinamento contempla a diminuição do estresse e sofrimento dos animais, o que sugere empregar protocolos que previnam e tratem a dor (RUSSELL; BURCH, 1959). Entretanto, a realidade é outra, já que ainda se negligencia o tratamento da dor em roedores e coelhos no período pós-operatório experimental (UHLIG et al., 2015).

Além de seu emprego em pesquisas, os leporinos ganham espaço como animais de companhia (WELLBEING, 2019), condição que podem passar por situações que cursam com dor como doenças dentárias, traumas, fraturas e cirurgias reprodutivas (LANGENECKER et al., 2009). Tanto nas intervenções clínicas, como experimentais, os coelhos são susceptíveis a distúrbios da motilidade intestinal, que podem ser causados ou agravados pela dor (WENGER, 2012).

Relata-se que a incapacidade de reconhecer a dor na espécie leporina como a causa para seu subtratamento (BENATO; ROONEY; MURRELL, 2019; HAWKINS, 2002). Outro elemento que dificulta avaliar a dor é que os coelhos evitam demonstrá-la quando na presença de um observador (BENATO; ROONEY; MURRELL, 2019; PINHO et al., 2019).

O comportamento é o método não invasivo mais utilizado para reconhecer a dor em animais (FARNWORTH et al., 2011) de diversas espécies (ARRAS et al., 2007; DUNBAR et al., 2016; KEATING et al., 2012; RIALLAND et al., 2012; ROUGHAN; FLECKNELL, 2003). Todavia, para uma avaliação efetiva, a escala comportamental deve ter validade e confiabilidade (BELSHAW et al., 2015) e um ponto de corte definido para analgesia (BRONDANI et al., 2013).

De acordo com uma revisão recente demanda-se a necessidade de uma escala de dor validada para que se realize o tratamento na espécie (BENATO; ROONEY; MURRELL, 2019).

Com base nas escalas desenvolvidas para ratos e camundongos (LANGFORD et al., 2010; SOTOCINAL et al., 2011), desenvolveu-se e validou-se parcialmente uma escala facial (RbtGs) (KEATING et al., 2012) para avaliar a dor em coelhos. Elaborou-

se a ferramenta por meio de imagens fotografadas durante a realização de tatuagem nas orelhas. Entretanto, não se validou a RbtGs para avaliar a dor pós-operatória. Outro estudo associou tal ferramenta à parâmetros fisiológicos e comportamentais, para avaliar a dor clínica em coelhos de estimação (CANCERs) (BANCHI et al., 2019), porém não se definiu um ponto de corte para resgate analgésico.

Em outras espécies algumas escalas para avaliar a dor se destacam por prover evidência de validade, confiabilidade e sensibilidade (MEROLA; MILLS, 2016) e por apresentarem pontos de corte definidos, como a de gatos (BRONDANI et al., 2013) e bovinos (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Baseando-se em metodologia similar à descrita nas espécies anteriormente citadas (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014), este estudo objetivou desenvolver e validar uma escala para avaliar a dor aguda em coelhos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Negligência na avaliação e tratamento da dor em coelhos

Os coelhos são amplamente utilizados em pesquisas científicas no mundo e muitos desses animais passam por procedimentos potencialmente dolorosos (HAMPSHIRE; ROBERTSON, 2015), visto que é a espécie animal mais comumente utilizada em pesquisas relacionadas a procedimentos ortopédicos, por apresentar baixo custo, facilidade de manuseio e maturação esquelética precoce (COULTER et al., 2011). Não apenas animais de experimentação, mas também coelhos *pet* (animais de companhia) podem ser submetidos a procedimentos e/ou tratamentos dolorosos ou apresentarem afecções que resultem em dor, necessitando de analgesia durante a prática clínica (FARNWORTH et al., 2011).

O princípio dos 3R's de Russel & Burch é utilizado na legislação que regula o uso de animais em experimentos em todo o mundo. O princípio se baseia na redução (*reduction*) do número de animais, na substituição (*replacement*) por métodos que não utilizem animais e no refinamento (*refinement*) dos estudos, para que haja diminuição do estresse e sofrimento dos animais, com estabelecimento de protocolos que previnam e tratem a dor, como o uso de analgésicos em procedimentos dolorosos (RUSSELL; BURCH, 1959). Entretanto, paradoxalmente, a dor em animais de laboratório é negligenciada e subestimada.

Ao avaliarem o uso de analgésicos em animais de laboratório no Canadá, foi constatado que número de animais que recebem analgésicos em experimentos é inferior ao número de animais submetidos a procedimentos dolorosos. Além disso, pesquisadores experientes relataram que não acreditavam que os animais eram capazes de esconder dor, sugerindo que a experiência com animais de laboratório não é suficiente para a detecção da dor nestas espécies (FENWICK; DUFFUS; GRIFFIN, 2014).

A administração de analgésicos a animais de laboratório no período pós-operatório em estudos experimentais publicados em revistas de alto impacto foi de apenas 10,4% (UHLIG et al., 2015) e animais que passam por procedimentos potencialmente mais dolorosos não são mais propensos a receber analgésicos (COULTER et al., 2011).

Estudos recentes relacionados à cirurgia experimental que envolvem procedimentos com dor intensa em coelhos não citam o uso de analgésicos: 1) 36

coelhos foram submetidos à subluxação de patela (WANG et al., 2018); 40 coelhos foram submetidos a osteotomia com serra para avaliar reparo ósseo (GHANMI et al., 2018); 3) 4 coelhos foram submetidos a retirada e reimplantação de parte da traquéia para avaliar a revascularização após autotransplante (AKOPOV et al., 2018); 4) 31 coelhos foram submetidos a amputação de membro pélvico para avaliação de contaminação de próteses (SHEVTSOV et al., 2018); 5) 40 coelhos foram submetidos à hemilaminectomia para estudar um mediador de fibrose e cicatrização (ALBIÑANA-CUNNINGHAM et al., 2018). Lamentavelmente, nenhum dos estudos anteriormente citados descrevem a avaliação da dor ou administração de analgésicos após a cirurgia.

A falta de um método simples e acurado para avaliar a dor aguda em animais de laboratório provavelmente contribui para a subutilização de analgésicos nestas espécies (HAWKINS, 2002).

2.2 Métodos de avaliação da dor em coelhos

Avaliar a dor em diferentes animais é um desafio, tanto pelas diferenças entre espécies, como por se tratar de uma experiência individual (MEINTJES, 2012). A dor afeta negativamente o bem-estar e, quando não controlada, é uma variável que pode atrapalhar a interpretação de resultados experimentais (KOHN et al., 2007).

Por não se expressarem verbalmente, ampliam-se as dificuldades da avaliação da dor, porque a falta de comunicação efetiva exige o reconhecimento e interpretação de sinais comportamentais por um observador (REID et al., 2007). Diferentes espécies respondem de diferentes maneiras a um estímulo nocivo e o comportamento normal nem sempre é indicativo de um estado de ausência de dor. A depender da espécie, o indivíduo pode evitar expressar a dor e apresentar comportamento "normal" como uma resposta inerente para limitar sua vulnerabilidade (DE OLIVEIRA et al., 2014; KOHN et al., 2007).

Dentre os métodos de avaliação da dor em coelhos estão os baseados em respostas evocadas a um estímulo mecânico, térmico ou elétrico (DIVINCENTI; MEIRELLES; WESTCOTT, 2016) que são pouco aplicáveis para avaliar clinicamente a dor pós-cirúrgica por não refletirem a dor espontânea. Além destes, existem os métodos fundamentados no comportamento.

Coelhas submetidas à ovariosalpingohisterectomia receberam tratamentos

com diferentes doses de meloxicam e foram avaliadas de forma remota nos períodos anterior e posterior à cirurgia, identificando diversos comportamentos discretos relativos à dor além de redução dos comportamentos de interação, exploração e atividade, que deram origem a um etograma (LEACH et al., 2009). O mesmo inventário comportamental foi utilizado por Farnworth et al. (2011) para avaliar coelhos machos alojados em gaiolas submetidos à laparotomia, observando comportamentos semelhantes. Weaver et al. (2010) observaram redução no consumo de alimento e no deslocamento de coelhas submetidas à OSH, além de redução na produção de fezes e perda de peso. Os comportamentos de saltar, explorar e se deslocar também reduziram após procedimento cirúrgico em coelhas submetidas à OSH alojadas em gaiolas (SCHNELLBACHER et al., 2017). Ao contrário do observado nestes estudos, ao se avaliar presencialmente coelhos submetidos a procedimento cirúrgico para implante em tíbia, não foi observado alteração nos escores de atividade entre os períodos avaliados após a cirurgia (DIVINCENTI; MEIRELLES; WESTCOTT, 2016).

Com base nas descobertas de Darwin à respeito das expressões faciais que podem refletir as emoções dos animais, incluindo a dor (DARWIN, 1873), escalas faciais para avaliar a dor em diversas espécies vem sendo desenvolvidas desde 2010, como a escala para avaliar a dor em camundongos (LANGFORD et al., 2010), ratos (SOTOCINAL et al., 2011), ferrets (REIJGWART et al., 2017), equinos (DALLA COSTA et al., 2014; VAN LOON; VAN DIERENDONCK, 2015), suínos (DI GIMINIANI et al., 2016) e felinos (EVANGELISTA et al., 2019; FINKA et al., 2019).

Baseando-se na escala facial de dor desenvolvida para camundongos (LANGFORD et al., 2010) e ratos (SOTOCINAL et al., 2011), Keating e colaboradores (2012) desenvolveram uma escala baseada nas tensões e contrações da face dos coelhos (RbtGs) para avaliar a dor com 5 unidades de ação facial: aperto orbital; achatamento da bochecha; formato da narina; mudança e posição das vibrissas e formato e posição das orelhas; com pontuação entre 0 (ação facial não presente); 1 (ação facial presente moderadamente) e 2 (ação facial obviamente presente).

Entretanto, os autores reportaram limitações no uso desta ferramenta: o posicionamento das orelhas não pôde ser utilizado nas avaliações devido a estas serem o local de realização do procedimento doloroso (tatuagem) ou de inserção acesso venoso e arterial. A escala foi desenvolvida com as expressões observadas durante o procedimento doloroso, sem anestesia geral, não havendo validação da escala em estados de dor menos agudos, como no momento pós-cirúrgico. Hampshire

e Robertson (2015) ao utilizarem a RbtGs excluíram o item formato da narina e achatamento da bochecha das pontuações por considerarem de difícil avaliação. Hedenqvist e colaboradores (2016), ao utilizarem a mesma escala para avaliar dor em coelhos submetidos a cirurgia em maxila, não detectaram as unidades de ação facial formato da narina e achatamento da bochecha, além de considerar o posicionamento das vibrissas de difícil avaliação.

Recentemente uma escala (CANCRs) foi desenvolvida com base em parâmetros fisiológicos, comportamentais e na RbtGs e aplicada a coelhos *pets*, demonstrando boa capacidade de identificar a dor e confiabilidade interobservadores (BANCHI et al., 2019). Entretanto, estes instrumentos foram apenas parcialmente validados e não fornecem um escore como ponto de corte para identificar a dor, ou seja, não auxiliam na tomada de decisões sobre a necessidade de analgesia.

2.3 Processo de validação de escalas

O desenvolvimento de uma escala é complexo. Há muitas etapas para sua validação e análises estatísticas detalhadas são necessárias (BOATENG et al., 2018).

Para ser fidedigna, a escala de dor deve descrever sucintamente suas categorias, apresentar validação do conteúdo, constructo e critério, possuir alto grau de confiabilidade intra e interobservador e determinar estatisticamente o ponto de corte para a intervenção analgésica (BELSHAW et al., 2015; BRONDANI et al., 2013).

Validade é a capacidade do instrumento em avaliar o que foi proposto. A validade de conteúdo refere-se à capacidade de adequação da escala em identificar o fator de interesse, no caso a dor, e resulta do julgamento de diferentes especialistas, que analisam a representatividade e qualidade técnica dos itens propostos (BOATENG et al., 2018) .

A validade do critério compara os escores obtidos pela escala com um método padrão-ouro (BELSHAW et al., 2015; DEVON et al., 2007). Quando não há disponível um método padrão-ouro, escalas unidimensionais podem ser utilizadas como a escala descritiva simples (EDS), escala numérica (EN) e a escala analógica visual (EAV) (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; TAFFAREL et al., 2015).

A validade do construto é avaliada pela responsividade da escala, ou seja, verifica se o instrumento é capaz de detectar alterações previsíveis ao longo do tempo, como o aumento do escore após o estímulo doloroso (CRELLIN et al., 2007) e por

isso é importante que os avaliadores sejam encobertos quanto ao momento que estão avaliando (TUYTTENS et al., 2016).

A confiabilidade de uma escala avalia a capacidade do instrumento em reproduzir resultados semelhantes quando empregado por diferentes observadores (interobservador) ou quando reavaliada pelo mesmo observador após um intervalo de tempo (intraobservador) (JIRKOF et al., 2019).

Para que a escala tenha aplicabilidade prática e auxilie na tomada de decisões quanto à administração de fármaco analgésico, é importante determinar uma pontuação mínima que indique a necessidade de intervenção analgésica, podendo utilizar a análise da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) para esta finalidade (BRONDANI et al., 2013; STREINER; CAIRNEY, 2013).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese do estudo é que lançando mão das mesmas ferramentas utilizadas para desenvolver escalas para gatos (BRONDANI et al., 2013), bovinos (DE OLIVEIRA et al., 2014) e equinos (TAFFAREL et al., 2015), possa se validar uma escala para avaliar a dor aguda em coelhos.

Este estudo objetiva 1) desenvolver uma escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) com base em filmagens de três estudos anteriores que avaliaram comportamentos de coelhos antes e após três diferentes procedimentos cirúrgicos; 2) refinar a escala proposta; 3) avaliar a confiabilidade intra e interobservador e a validade de conteúdo, critério e constructo da escala; 4) Definir um ponto de corte para a intervenção analgésica; 5) Classificar a intensidade da dor com base nos escores fornecidos pela RPBS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo seguiu a legislação brasileira do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (KILKENNY et al., 2010) e abrangeu dois dos princípios dos 3 R's (redução e refinamento) (RUSSELL; BURCH, 1959). Trata-se de um estudo bicêntrico, oportunista, que visa promover o bem-estar animal por propiciar uma ferramenta para avaliar a dor e facilitar a tomada de decisão para seu tratamento (refinamento). Utilizaram-se filmagens do período perioperatório de 58 coelhos submetidos à três tipos de cirurgias realizadas para três outros estudos (redução) (Tabela 1).

Tabela 1 - Definição dos cinco grupos experimentais com base nos três estudos prévios envolvidos neste trabalho

Cirurgia	Grupo	Animais	Pré-medicação	Indução Anestésica	Manutenção Anestésica	Resgate analgésico	Referência
Ortopedia	ORTO	11 fêmeas e 17 machos	meperidina 5mg/kg (IM)	isoflurano	isoflurano e fentanil 2µg/kg (IV)	morfina 2mg/kg + meloxicam 1mg/kg (IM)	Não publicado.
OSH	OSH-Placebo	7 fêmeas	placebo (VO)	propofol 10 mg/kg (IV)	sevoflurano	Não realizado.	(LEACH et al., 2009)
	OSH-Melox	7 fêmeas	meloxicam 1mg/kg (VO)				
Orquiectomia	ORQ-Melox	8 machos	meloxicam 0,2mg/kg (SC)	propofol 10mg/kg (IV)	sevoflurano	Não realizado.	Não publicado.
	ORQ-Multi	8 machos	meloxicam 0,6 mg/kg e buprenorfina 0,03mg/kg (SC)		sevoflurano; infiltração local de lidocaina 4mg/kg e bupivacaína 2 mg/kg		

ORTO: ostectomia parcial de rádio; OSH: ovariosalpingohisterectomia; IM: intramuscular; VO: via oral; SC: subcutânea; IV: intravenosa.

4.1 Animais e delineamento experimental

4.1.1 Animais submetidos à cirurgia ortopédica - Grupo Orto (estudo prospectivo)

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob os protocolos nº 0156/2018 e 019155/17 das Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp Câmpus de Botucatu e da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Câmpus de Jaboticabal.

Utilizaram-se 28 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.

Como critério de inclusão, 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 alocados em uma cunicultura experimental adaptada para alojar animais de experimentação, com ventilação natural controlada por cortinas 40 dias antes da cirurgia. Manteve-se cada coelho em gaiola individual de aço inoxidável, com dimensões de 60 cm³, piso de grade e bandeja para dejetos higienizada duas vezes ao dia. O estudo foi conduzido entre os meses de agosto e setembro, com fotoperíodo natural local de aproximadamente 12 horas de luz por dia e temperatura média de 21°C.

Quatro dias antes das filmagens, alocaram-se os animais em gaiolas específicas dentro no mesmo alojamento. Forneceu-se água e ração seca¹ *ad libitum*, pedaços de cenoura diariamente e feno de tifton (*Cynodon spp.*) duas vezes por semana. Para suprir as necessidades de interação e mastigação dos coelhos, forneceram-se pinhas de eucalipto, substituídas ao se oferecer cenoura no início de cada filmagens.

Não se empregou jejum hídrico ou alimentar pré-anestésico. Para que os avaliadores dos vídeos fossem encobertos em relação ao momento de avaliação quanto à tricotomia, dois dias antes da cirurgia submeteram-se os animais à anestesia

¹ Fri-Coelho, FRI-RIBE, Trouw Nutrition, São Paulo, SP, Brasil

inalatória com 4 - 5 Vol % de isoflurano² diluído 4L/min de oxigênio por meio de câmara de indução, seguido de máscara facial, de modo a manter o plano anestésico superficial, confirmado pela presença dos reflexos podal e pinçamento da orelha, por 3 a 5 minutos. Realizou-se tricotomia da região cirúrgica, correspondente ao membro torácico direito, das orelhas para acesso venoso, e região distal do membro torácico esquerdo para monitoração com Doppler ultrassônico.

No dia da cirurgia, após se constatar ausência de alterações em exame físico mediante a inspeção, auscultação cardíaca e respiratória e mensuração da temperatura retal, os coelhos receberam 5 mg/kg de petidina³ por via intramuscular (IM) na musculatura epaxial lombar. A seguir, inseriu-se um cateter 24G na veia marginal da orelha e instituiu-se fluidoterapia com 3 mL/kg/h de Ringer lactato, por meio de bomba de infusão de seringa e oxigenioterapia com 2L/min de oxigênio puro via máscara facial por três minutos. Induziu-se a anestesia com 3 a 5 Vol % de isoflurano, diluído em 2L/min de oxigênio, via máscara facial. Após a ausência dos reflexos interdigital e do pinçamento da orelha, instilou-se 0,1 mL de lidocaína⁴ na região das aritenoides, mantendo-se por mais um minuto a inalação de isoflurano. Procedeu-se à intubação orotraqueal guiada por capnografia⁵ com tubo endotraqueal de 2,5-3,5 mm de diâmetro interno, compatível com o tamanho do animal. Se, após três tentativas, não fosse possível a intubação, a anestesia seria mantida via máscara facial, o que ocorreu com três coelhos de um total de 28 animais. Ajustou-se a concentração inspirada do isoflurano para manter plano anestésico cirúrgico e administrou-se 2 µg/kg de fentanil⁶ pela via intravenosa (IV) imediatamente antes do início da cirurgia.

Registrou-se a monitoração anestésica a cada cinco minutos, baseada na frequência cardíaca e respiratória, saturação periférica de oxigênio da hemoglobina, e fração expirada de CO₂ por monitor multiparamétrico⁷, a temperatura retal por termômetro digital e a pressão arterial sistólica não invasiva por meio de Doppler ultrassônico⁸. Registrou-se o início e o fim da cirurgia e possíveis intercorrências anestésicas.

² Isoforine 100%. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil

³ Dolosal 50mg/mL. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Xylestin 2% sem vasoconstritor. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil

⁵ Capnostat 5. Digicare Animal Health, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁶ Fentanest 0,0785 mg/mL. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil

⁷ LifeWindow LW9x. Digicare Animal Health, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁸ Doppler Vascular modelo 811-B. Parks Medical Inc, OR, USA

Após antissepsia do membro com clorexidina degermante 2% seguido de clorexidina alcoólica 0,5%, realizou-se incisão de pele de 2,5cm na região craniomedial do rádio, divulsionou-se o tecido subcutâneo e musculatura e expôs-se a diáfise distal do rádio. Procedeu-se a ostectomia parcial de 1 cm de extensão na diáfise radial, 1,5 cm proximal a articulação radiocárpica, com serra oscilatória e especímetro para as mensurações. Removeu-se o segmento do rádio juntamente com seu perióstio e procedeu-se a refia.

Uma hora após a recuperação anestésica e a filmagem do momento de maior dor, todos os animais receberam resgate analgésico com 2 mg/kg de morfina⁹ e 1 mg/kg meloxicam¹⁰ IM.

A partir de 24 horas após a cirurgia, os animais receberam 5 mg/kg de cloridrato de tramadol¹¹ IM a cada 8 horas durante três dias.

Realizaram-se filmagens¹² dos animais do grupo ORTO nos momentos basal, dor, analgesia e 24h como (Tabela 2).

Tabela 2 - Definição dos momentos de filmagem avaliados nos 5 grupos.

Grupo	Momento basal	Momento Dor	Momento Analgesia	Momento 24h
ORTO	24 horas antes da cirurgia	1 hora após a cirurgia	3 horas após o resgate analgésico	24 horas após a cirurgia
OSH-Pla	22 horas antes da cirurgia	3 horas após a cirurgia	Não avaliado	27 horas após a cirurgia
OSH-Melox				
ORQ-Melox	22 horas antes da cirurgia	2 horas após a cirurgia	Não avaliado	24 horas após a cirurgia
ORQ-Multi				

Momento basal: momento sem dor, antes da cirurgia; Momento dor: momento de maior dor esperada no pós-operatório; Momento analgesia: momento após a administração do resgate analgésico (meloxicam 1mg/kg + morfina 2mg/kg IM), administrado apenas ao grupo ORTO; Momento 24h: aproximadamente um dia após a cirurgia.

Para elaboração de um etograma utilizaram-se as filmagens dos momentos

⁹ Dimorf 1%. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil

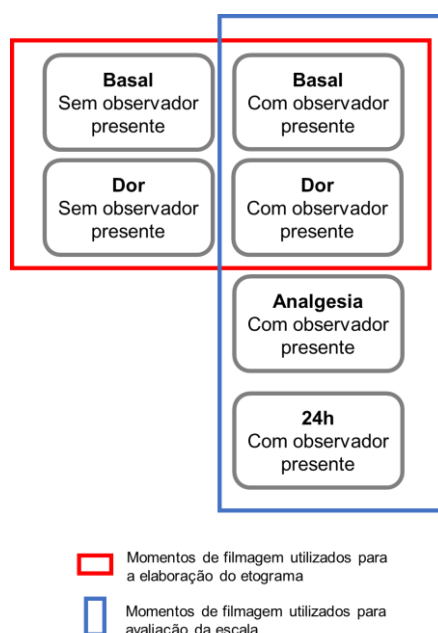
¹⁰ Maxicam 2%. Ourofino, São Paulo, SP, Brasil.

¹¹ Cloridrato de tramadol, Teuto, Goiás, Brasil

¹² GoPro Hero 5 Black. GoPro Inc., California, USA

Basal e Dor do Grupo ORTO (Apêndices A e B). Em cada momento, as filmagens foram realizadas por 5 minutos na ausência do experimentador e a seguir por 5 minutos na presença do experimentador, que era familiar aos animais. Para a avaliação da escala, utilizaram-se as filmagens na presença do experimentador dos momentos basal, dor, analgesia e 24h. A Figura 1 demonstra quais foram as filmagens dos animais submetidos à cirurgia ortopédica (grupo ORTO) utilizadas para elaborar o etograma e avaliar a escala. Analisaram-se os vídeos pelo método animal focal (MARTIN; BATESON, 1986) pela primeira vez para identificar a ocorrência dos comportamentos e depois tantas vezes quanto necessário para que se computassem a frequência (número de início de ocorrências) e duração (em segundos) de todos os comportamentos. Para estados comportamentais registrou-se a duração em segundos e para eventos breves, apenas a frequência. Avaliaram-se alguns comportamentos quanto a duração e frequência, como os de auto-limpeza do corpo e interação com a pinha e a cenoura.

Figura 1 - Diagrama das filmagens utilizadas para elaborar o etograma e filmagens para avaliar a escala no período perioperatório de coelhos submetidos à cirurgia ortopédica.



Além destes vídeos, geraram-se 24 vídeos de 4 coelhos fêmeas e 4 machos do grupo ORTO no dia anterior a cirurgia às 8h, 14h e 22h, para avaliar se os escores da escala variavam no estado de normalidade em relação ao horário do dia e ciclo

circadiano.

4.1.2 Animais submetidos à ovariosalpingohisterectomia - Grupos OSH-Pla e OSH-Melox (estudo retrospectivo)

O estudo foi conduzido sob licença de pesquisa e aprovado pelo Secretário de Estado do Ministério do Interior, de acordo com a Lei de Animais de 1986 do Reino Unido (Procedimentos Científicos) e pelo comitê de ética local da Universidade de Newcastle. As instalações foram aprovadas de acordo com o Código de práticas para o alojamento e cuidado de animais utilizados em procedimentos científicos¹³.

Utilizaram-se 14 coelhos com 12 semanas de idade, pesando entre 1,8 e 2,3 kg, provenientes da Harlan UK Limited ¹⁴. O manejo dos animais e os detalhes do procedimento cirúrgico estão descritos em estudo anterior (LEACH et al., 2009). No dia da cirurgia, os animais foram aleatorizados e receberam placebo ou 1 mg/kg de meloxicam VO 1 hora antes da cirurgia. As filmagens foram realizadas de forma remota¹⁵, com duração de 20 minutos para cada um dos momentos e utilizou-se para o presente estudo os momentos de filmagem descritos na Tabela 2.

4.1.3 Animais submetidos à orquiectomia – Grupos ORQ-Melox e ORQ-Multi (estudo retrospectivo).

O estudo foi conduzido sob licença de pesquisa e foi aprovado pelo Secretário de Estado do Ministério do Interior, de acordo com a Lei de Animais de 1986 do Reino Unido (Procedimentos Científicos) e pelo comitê de ética local da Universidade de Newcastle. As instalações foram aprovadas de acordo com o Código de práticas para o alojamento e cuidado de animais utilizados em procedimentos científicos (Home Office, 2005) e Diretriz Européia EU 2010/63.

Utilizaram-se 16 coelhos com 12 semanas de idade, pesando entre 1,8 e 2,5 kg, provenientes da Harlan UK Limited¹⁴.

Os coelhos foram alojados individualmente em baias com maravalha

¹³ Home Office, 2005

¹⁴ Bicester, UK

¹⁵ Sony DCR-VX2100E, Sony, China

autoclavada¹⁶ com profundidade média de 3 cm. Instituiu-se fotoperíodo de 12h de luz, temperatura ambiente de 22 ± 2 °C e $50 \pm 10\%$ de umidade relativa. Alimento seco¹⁷ e água foram fornecidos *ad libitum*. Os animais eram livres de patógenos comuns, de acordo com as Recomendações de Monitoramento de Saúde da FELASA (2002). Os coelhos foram aclimatados por um período de 14 dias antes do início do estudo.

Previamente à cirurgia, os animais foram aleatorizados e receberam 0,2 mg/kg de meloxicam (ORQ-Melox) por via subcutânea (SC) ou 0,6mg/kg de meloxicam e 0,03 mg/kg de buprenorfina SC (ORQ-Multi) 30 minutos antes da anestesia. Realizou-se bloqueio anestésico por meio de infiltração na linha de incisão e no cordão espermático e “*splash-block*” na ferida, nos animais do grupo ORQ-Multi com 4mg/kg de lidocaína e 2mg/kg de bupivacaína e do grupo ORQ-Melox com solução salina.

Para a indução anestésica, administrou-se 10 mg/kg de propofol IV. Os coelhos foram posicionados em uma manta de aquecimento¹⁸, intubados e mantidos em anestesia inalatória com sevoflurano 4-6% Vol em oxigênio 4 L/min, por no máximo 30 minutos. Previamente à cirurgia, realizou-se antissepsia da região com clorexidine¹⁹ e bloqueio infiltrativo da linha de incisão. Realizou-se incisão de 2 cm na pele, seguida por dissecação dos testículos e infiltração de salina (ORQ-Melox) ou anestésicos locais (ORQ-Multi) no cordão espermático, seguido por pinçamento e transfixação com Vicryl 3.0. Previamente à sutura, aplicou-se “*splash block*” com solução salina (ORQ-Melox) ou anestésicos locais (ORQ-Multi) e procedeu-se à rafia. Um mesmo cirurgião experiente realizou todos os procedimentos. Após a cirurgia, os coelhos se recuperaram em uma incubadora a 25°C por uma hora, onde foram monitorados. A ferida cirúrgica e o estado de saúde dos animais foram verificados diariamente até que a ferida estivesse completamente cicatrizada.

Instituiu-se protocolo de resgate analgésico com 0,05mg/kg de buprenorfina quando o animal apresentasse mais de 4 comportamentos de dor anteriormente descritos (LEACH et al., 2009) em 5 minutos. Todos animais se recuperaram da cirurgia sem complicações.

As filmagens foram realizadas de forma remota ²⁰, com duração de 15 minutos

¹⁶ Lillico Biotechnology, Bletchworth, Reino Unido

¹⁷ Rabma, SDS, Whitham, Essex, Reino Unido

¹⁸ Harvard Apparatus, Edenbridge, Reino Unido

¹⁹ Hydrex Dema Spray, Adam Healthcare, Leeds, Reino Unido

²⁰ Sony DCR-VX2100E, Sony, China

para cada um dos momentos como descrito na Tabela 2.

4.2 Seleção dos comportamentos e elaboração da escala

Elaborou-se a escala de acordo com os comportamentos considerados relevantes no estudo da cirurgia ortopédica por apresentarem diferenças entre o momento basal e dor, tanto na presença como na ausência do observador, além de comportamentos descritos anteriormente como importantes para avaliar a dor visceral no estudo com coelhas submetidas à OSH (LEACH et al., 2009).

4.3 Avaliação dos vídeos

Os vídeos dos 58 animais foram editados pela pesquisadora principal do estudo de forma a gerar vídeos de 2 a 3 minutos que representassem proporcionalmente a duração e frequência dos comportamentos observados nos vídeos originais.

Produziram-se 226 vídeos correspondentes aos 1) momentos basal, dor, analgesia e 24h dos 28 animais do grupo ORTO, 2) 24 vídeos provenientes de oito animais do grupo ORTO no dia anterior à cirurgia às 8h, 14h e 20h, e 3) momentos basal, dor e 24h dos 30 animais submetidos às cirurgias de tecidos moles (OSH e orquiectomia).

4.4 Seleção e treinamento de avaliadores

Para avaliar os vídeos, além da pesquisadora principal veterinária anestesiologista, selecionaram-se outros três avaliadores, médicos veterinários. Todos avaliadores possuíam tempo de experiência semelhante e realizaram residência em anestesiologia veterinária.

Antes das avaliações, os avaliadores receberam treinamento para se familiarizarem com a escala e com vídeos correspondentes a exemplos de cada comportamentos. Após uma semana de treinamento, foram enviados 10 vídeos dos animais submetidos às três cirurgias nos momentos dor e basal para avaliação da escala de forma encoberta quanto ao momento. Para esta fase, selecionaram-se vídeos que representassem os comportamentos da escala de forma clara. Uma

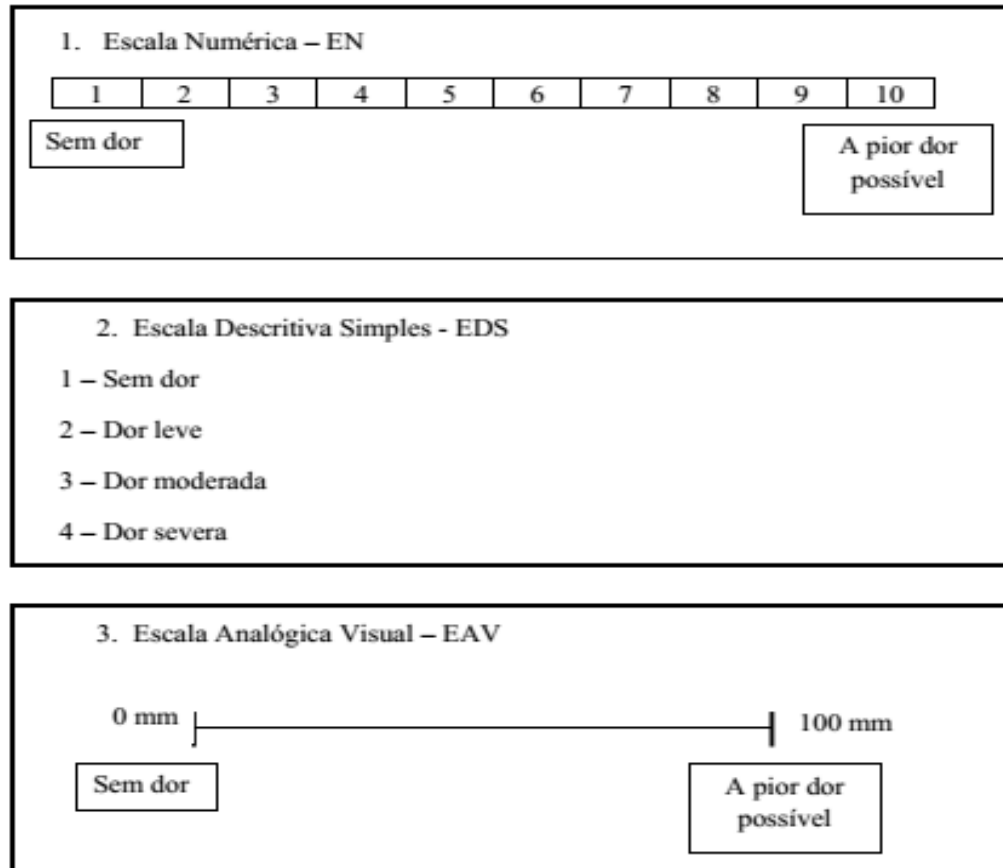
semana após a primeira avaliação, os avaliadores receberam os mesmos 10 vídeos realeatorizados para a segunda avaliação. Foram considerados aptos a iniciar as avaliações definitivas dos vídeos os observadores que obtivessem uma confiabilidade intraobservador boa ou excelente no escore total da escala. Dentre os avaliadores selecionados, os que apresentassem confiabilidade intraobservador de moderada a ruim em algum dos itens da escala durante o treinamento, recebiam novos vídeos de exemplos de comportamentos para melhorar suas habilidades naquele item.

4.5 Avaliação oficial

Os avaliadores selecionados assistiram aos vídeos em ordem aleatória, sem conhecimento do momento avaliado, mediante análise encoberta, durante cinco semanas, com uma meta de avaliação de ao redor de 40 vídeos por semana, para evitar que assistissem a muitos vídeos de uma só vez em um curto período. Os avaliadores assistiam aos vídeos quantas vezes fossem necessárias para realizar as pontuações. Recomendou-se que não se analisassem os vídeos por mais de uma hora por dia para evitar fadiga mental e solicitou-se que realizassem as avaliações em condições tranquilas, sem interferência de outras pessoas ou interrupções de origem externa para não comprometer as análises.

Após assistir cada vídeo, sempre na mesma ordem cronológica cada um dos avaliadores respondeu com base em sua experiência clínica se forneceria resgate analgésico naquele momento ou não. A seguir, pontuavam a escala numérica (EN) na qual 1 correspondia a “sem dor” e 10 a “pior dor possível”; a escala descritiva simples (EDS) onde 1 correspondia a “sem dor” e 4 a “dor intensa” e a escala analógica visual (EAV) na qual 0 cm correspondia a “sem dor” e 10 cm a “pior dor possível” (Figura 2) e por último pontuavam a escala proposta (RPBS), e identificavam qual(is) subitem(s) da escala deu origem ao escore de cada item.

Figura 2 - Escalas utilizadas para avaliação da dor. 1 – EN, com escore 1 (sem dor) a 10 (pior dor possível); 2 – EDS com quatro níveis descritivos; 3 – EAV com escore 0mm (sem dor) à 100mm (pior dor possível).



Um mês após terminarem a primeira avaliação, os avaliadores assistiram novamente aos mesmos vídeos reatorizados, para estabelecer-se a confiabilidade intraobservador.

4.6 Análise Estatística

4.6.1 Seleção de comportamentos (grupo ORTO) para a escala

Para selacionar os comportamentos avaliados no etograma do estudo da ortopedia, utilizou-se o software Graph Pad Prism 5.0 considerando α de 5%. De acordo com o teste de Shapiro-Wilk e análise da distribuição em gráfico de caixa e histograma, os dados foram definidos como não-normais. Comparou-se a duração e frequência dos comportamentos entre os momentos basal e dor pelo teste de Wilcoxon bicaudal para amostras pareadas.

4.6.2 Refinamento e validação da escala

As análises estatísticas do refinamento e validação da escala (Tabela 3) foram realizadas no software R no ambiente de desenvolvimento integrado Rstudio (RSTUDIO TEAM, 2016). Para todas as análises considerou-se α de 5%.

Tabela 3 - Descrição das análises e testes estatísticos para o refinamento e validação da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).

Análise	Fase	Descrição	Grupos	Momentos	Avaliação	Teste estatístico
Validação de conteúdo	R	Um comitê composto por três especialistas analisou cada subitem referente a cada item da escala em: relevante (+1), não sabe (0) ou irrelevante (-1).	N/A	N/A	N/A	Somou-se todos os valores de cada subitem (-1, 0 ou 1) e dividiu-se pelo número de observadores. Incluíram-se na escala os itens com escore total > 0,5.
Associação múltipla	RV	Analisou-se a associação múltipla dos itens entre si por meio da análise de componentes principais, para definir o número de dimensões determinados pelos diferentes itens da escala.	Todos os grupos.	Basal, dor e 24h.	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Análise de componentes principais – ACP (funções “princomp” e “get_pca_var” dos pacotes “stats” e “factoextra” respectivamente). De acordo com o critério de Kaiser (KAISER, 1958), selecionaram-se dimensões representativas dos componentes com autovalor > 1 e variância > 20 e cada item da escala com valor de carga $\geq 0,50$ ou $\leq -0,50$. As elipses do biplot foram construídas pelo método “confidence” de acordo com os momentos de avaliação da dor e indivíduos.
Padrão de ocorrência ao longo do dia	R	Verificou-se se os escores de cada item e da somatória da RPBS ocorriam da mesma forma em condições sem dor (antes da cirurgia) para três momentos do dia	8 animais do grupo ORTO	Basal [8h (manhã); 14h (tarde); 20h (noite)]	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Utilizou-se o teste de Friedman com correção de p-valor com teste de Bonferroni . Interpretação esperada: manhã = tarde = noite
Frequência de ocorrência	R	Avaliou-se a porcentagem de ocorrência de cada item e subitem da escala.	Todos os grupos.	MA	Todos os avaliadores na 2ª avaliação.	Análise descritiva. Interpretação: Aceitaram-se itens com ocorrência > 30% das avaliações em MA e subitens com mais de 50 ocorrências das avaliações em MA.

Confiabilidade intraobservador (Repetibilidade)	SRV	Estimou-se o nível de concordância entre as duas avaliações de cada observador para os escores de cada item, subitem e a somatória da RPBS, EN, EDS, EAV e recomendação para resgate analgésico.	Todos os grupos.	Basal, dor e 24h.	Todos os avaliadores	Para os escores dos itens da escala RPBS, da EN, EDS, e recomendação de resgate analgésico usou-se o coeficiente de kappa ponderado (k_w) (SCHUSTER, 2004), sendo que as discordâncias foram ponderadas de acordo com a sua distância ao quadrado da concordância perfeita. Estimou-se o intervalo de confiança (IC) de 95% do k_w (função “cohen.kappa” do pacote “psych”). Para a EAV foi usado o coeficiente de correlação intraclass (ICC) tipo “agreement” e seu IC de 95% (função “icc” do pacote “irr”) (COHEN, 1968; SCHUSTER, 2004). Para a somatória da escala comportamental foi usado o ICC tipo “consistency” e seu IC de 95%. Interpretação de k_w e ICC: muito boa 0,81 – 1,0; boa: 0,61 – 0,80; moderada: 0,41 – 0,60; razoável: 0,21 – 0,4; pobre < 0,2. Utilizou-se k_w e ICC > 0,60 como critério para refinar a escala. Aceitaram-se valores > 60 (ALTMAN, 1991).
Confiabilidade interobservador (Reprodutibilidade)	RV	1) Reprodutibilidade - estimou-se o nível de concordância entre o observador padrão-ouro e os outros três observadores na 2ª fase de avaliação, utilizando os escores de cada item, subitem e a somatória da RPBS, EN, EDS, EAV e a necessidade de resgate analgésico.	Todos os grupos.	Basal, dor e 24h.	Todos os avaliadores na 2ª avaliação.	Utilizou-se o ICC tipo “consistency” e seu IC de 95%. Grau de confiabilidade ICC (consistência): muito boa: 0,81 - 1,0; boa: 0,61 - 0,80; moderada: 0,41 - 0,60; razoável: 0,21 - 0,4; pobre < 0,2 (80). Aceitaram-se valores > 50 (ALTMAN, 1991).
	V	2) Matriz de concordância - gerou-se uma matriz para avaliar a concordância da pontuação total da escala comportamental na 2ª fase de avaliação de cada observador <i>versus</i> todos os outros observadores.				

Determinação do avaliador padrão-ouro	RV	Determinação do avaliador referência que foi nomeado como observador padrão-ouro para empregar as suas avaliações nos testes seguintes.	Todos os grupos.	Basal, dor e 24h.	Todos os avaliadores	Após as duas avaliações oficiais, determinou-se o avaliador padrão-ouro com base nos critérios de 1) maior confiabilidade intraobservador e 2) maior coerência quanto à resposta se faria resgate analgésico no momento basal (não esperado) e no momento de dor (esperado), empregando-se a seguinte equação: $COE = ResDor - ResBasal$, onde COE = coerência; ResDor = resgates analgésicos no momento de dor; ResBasal = resgates analgésicos no momento basal, ou seja, no momento sem dor.
Correlação item-total	RV	Para análise da homogeneidade de cada item da escala e para investigar itens inflacionários correlacionou-se cada item e a somatória de todos os outros itens, exceto o item avaliado.	Todos os grupos.	MA	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Coefficiente de correlação de postos de Spearman (r_s ; função "rcorr" do pacote "Hmisc"). Interpretação do r_s : valores adequados 0,3-0,7 (STREINER; NORMAN, 2016) - aceitaram-se os itens >0,3.
Validade de critério	RV	Teste de validação concorrente - estimou-se a correlação da somatória da RPBS com as EN, EDS, EAV.	Todos os grupos.	Basal, dor, 24h e MA.	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Coefficiente de correlação de postos de Spearman (r_s ; função "rcorr" do pacote "Hmisc"). Interpretação do grau de correlação r_s ($p < 0,05$): 0 – 0,35: correlação baixa; 0,35 – 0,7: correlação média; 0,7 – 1,0: correlação alta (DE OLIVEIRA et al., 2014)
Validade de construto	RV	Responsividade – comparou-se os escores de cada item e somatória da RPBS, EN, EDS, EAV e a necessidade de resgate analgésico ao longo do tempo.	ORTO, OSH-Pla, ORQ-Melox*.	Basal, dor e 24h	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Para a recomendação de resgate analgésico aplicou-se a análise de regressão logística (função "glm" do pacote "stats") usando o teste de Tukey (função "lsmeans" do pacote "lsmeans") como teste post hoc. A normalidade de cada variável em cada momento foi avaliada

			ORTO**	Basal, dor, analgesia e 24h		por gráficos de caixas e histogramas (funções “boxplot” e “histogram” dos pacotes “graphics” e “lattice” respectivamente). A partir destes gráficos todas as variáveis restantes foram consideradas não paramétricas, exceto a somatória RBPS. Desta forma utilizou-se o teste de Friedman (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014) (função “friedman.test” do pacote “stats”) em que o p-valor foi corrigido com o procedimento de Bonferroni (função “pairwiseSignTest” do pacote “rcompanion”). Para a somatória RBPS foi usado modelo linear misto pois o modelo apresentou distribuição residual gaussiana, incluído os momentos de coleta como efeito fixo, e o efeito aleatório de indivíduo; foi utilizado o teste de Bonferroni post hoc. As diferenças entre os momentos foram identificadas por letras diferentes (função “cldList” do pacote “rcompanion”). Interpretação: espera-se que as diferenças dos escores ocorram da seguinte forma: dor>analgesia≥24h>basal.
Consistência interna	RV	Estimou-se a consistência interna dos escores de cada item da escala e o processo foi feito excluindo cada item.	Todos os grupos.	MA	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Coeficiente alfa de Cronbach (CRONBACH, 1951) (α ; função “cronbach” do pacote “psy”) Interpretação: 0,60-0,64, minimamente aceitável; 0,65-0,69 aceitável; 0,70-0,74 bom; 0,75-0,80 muito bom; e > 0,80 excelente (JENSEN, 2003; STREINER, 2003; STREINER; NORMAN, 2016)
Especificidade	RV	Os escores de cada item foram transformados em dicotômicos: 0 = 0; 1 e 2 = 1.	Todos os grupos. juntos e isolados.	Basal.	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	$E(basal) = \frac{VN}{VN+FP}$ E= especificidade. VN = verdadeiro negativo (escore que representava ausência de dor = 0). FP = falso positivo (escores que representavam expressão de dor = 1 ou 2). Interpretação: excelente 95 - 100%; boa 85 - 94,9%; moderada 70 - 84,9% não é específico < 70%. Só se incluíram itens > 70%.

Sensibilidade	RV		1)ORTO, OSH-Pla, ORQ-Melox, (juntos) e 2) cada um dos 5 grupos isolados.	Dor.	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	$S(dor) = \frac{VP}{VP+FN}$ S = sensibilidade. VP = verdadeiro positivo (escores que representavam expressão de dor = 1 ou 2). FN = falso negativo (escores que representavam ausência de dor = 0). Interpretação: excelente 95 - 100%; boa 85 - 94,9%; moderada 70 - 84,9% não é sensível < 70%. Só se incluíram itens > 70%.
Distribuição de escores	V	Com base em uma tabela com a distribuição da frequência da dos escores 0, 1 ou 2 de cada item da escala, foram construídos gráficos.	Todos os grupos.	Basal, dor, 24 h e MA.	2ª avaliação do avaliador padrão-ouro.	Análise descritiva.
Ponto de resgate analgésico e zona de incerteza diagnóstica	V	Utilizou-se os dados da recomendação ou não de analgesia de acordo com a experiência clínica , como valor verdadeiro e a somatória da RPBS como valor preditivo para construir uma curva de característica de operação do receptor (ROC) . Em seguida determinou-se o ponto de corte para resgate analgésico com base no índice de Youden e sua zona de incerteza diagnóstica . Ademais, calculou-se a área sob a curva (ASC) para indicar a capacidade discriminatória da escala RPBS.	Todos os grupos.	Basal, dor e 24h.	2ª avaliação de todos os avaliadores individualmente e em conjunto.	$IY = (S + E) - 1$; IY = Índice de Youden; S = sensibilidade; E = especificidade. Análise da curva de característica de operação do receptor (ROC) pela abordagem não paramétrica (HAJIAN-TILAKI et al., 1997)(função “roc” do pacote “pROC”) e da área sob a curva (ASC): representação gráfica da relação entre os “VP” (S) e os “FP” (1-E). IY é o ponto de maior sensibilidade e especificidade simultaneamente, determinado pela curva ROC (DEYO; DIEHR; PATRICK, 1991). Interpretação: ASC ≥ 0,90 - alta capacidade discriminatória da escala (RAY et al., 2010). Determinou-se a zona de incerteza diagnóstica por dois métodos, calculando: 1º) o intervalo de confiança de 95% (IC) reamostrando 1.001 vezes a curva ROC original pelo método bootstrap (funções “ci.coords” e “ci.auc” do pacote “pROC”); 2º) o intervalo que compreende baixa sensibilidade e baixa especificidade foi calculado através da determinação dos limiares do índice de Youden

						que correspondiam a <90% de sensibilidade e <90% de especificidade. O maior intervalo dentre os dois métodos de todos os avaliadores agrupados foi considerado a zona de incerteza diagnóstica (RAY et al., 2010).
	V	Calculou-se a frequência e porcentagem dos animais pontuados na zona de incerteza diagnóstica do ponte de corte de todos os avaliadores para a escala.				Análise descritiva.
Determinação da intensidade da dor	V	Os escores foram classificados por intensidade: baixa, intermediária ou alta.	ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox*.	Dor.	2ª avaliação de todos os avaliadores	Empregou-se análise de agrupamento não hierárquica pelo método “máximo” calculando a distância entre a matriz pelo “centroide” (funções “dist” e “hclust” do pacote “stats”) (TRINDADE et al., 2020) seguido por teste de Kruskal-Wallis (função “kruskal” do pacote “agricolae”) para avaliar a diferença entre os grupos formados pela análise de agrupamento.

N/A: não aplicável. Fase R: refinamento; V: validação; S: seleção de avaliadores. Padrão-ouro: avaliador com maior confiabilidade intraobservador e maior coerência. Grupo ORTO: coelhos submetidos à ostectomia parcial de rádio; Grupo OSH-Pla: coelhas submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) pré-medicação com placebo; Grupo OSH-Melox: coelhas submetidas à OSH pré-medicação com meloxicam 1mg/kg VO; Grupo ORQ-Melox: coelhos submetidos à orquiectomia pré-medicação com meloxicam 0,2mg/kg SC; Grupo ORQ-Multi: coelhos submetidos à orquiectomia sob bloqueio anestésico com Lidocaína (4mg/kg) e Bupivacaína (2mg/kg) e pré-medicação com meloxicam 0,6mg/kg e Buprenorfina 0,03mg/kg SC. Momento basal: sem dor, antes da cirurgia; momento dor: maior dor esperada após a cirurgia; momento analgesia (apenas para grupo ORTO): após a administração do resgate analgésico (meloxicam 1mg/kg + morfina 2mg/kg IM); momento 24h: aproximadamente um dia após a cirurgia; MA: momentos agrupados (basal + dor + 24h).

*Utilizaram-se os grupos ORTO, ORQ-Melox e OSH-Pla por serem os grupos que biologicamente representam menor efeito do protocolo analgésico e, portanto, apresentam maior dor no momento or. **Utilizou-se o grupo ORTO isoladamente quando foi avaliado o momento analgesia, por ser o único grupo em que houve esta avaliação.

5. RESULTADOS

Nos coelhos submetidos à cirurgia ortopédica, os comportamentos ativo, posicionar-se na frente da gaiola, mudar de posição, postura quadrupedal, bípede, mudar de postura, orelhas eretas, olhos abertos, saltar, chacoalhar a cabeça, explorar, roer, comer ração, comer cenoura, interagir com a pinha e auto-limpeza do corpo reduziram após a cirurgia e os comportamentos inativo, posicionar-se no fundo da gaiola, postura deitado, orelhas semifletidas, olhos semi-cerrados, lamber área afetada, movimentar o corpo dorsalmente, retraindo, tremer, suspender membro e tentar levantar aumentaram (Apêndice B). Com exceção dos comportamentos roer e chacoalhar a cabeça que não foram considerados importantes para identificar a dor pela pesquisadora, e o posicionamento na frente ou fundo da gaiola que foi representado pelo comportamento mudar de posição, todos os outros comportamentos citados foram incluídos na escala.

Além destes, os comportamentos andar em ritmo muito lento, pressionar o abdômen contra o chão e apresentar espasmos que foram exclusivamente importantes para avaliar a dor no estudo com OSH (LEACH et al., 2009) também foram incluídos. De acordo com esta seleção de comportamentos, elaborou-se a escala com 3 níveis de pontuação (0, 1 ou 2) com as seguintes categorias comportamentais: postura, atividade, interação e apetite, expressão facial, atenção à área afetada e miscelânea de comportamentos (Apêndice C).

Refinamento da RPBS

Todos os itens foram aprovados pelo comitê de especialistas na validação de conteúdo (Apêndice D), e por isso foram incluídos na escala para avaliar os vídeos.

O refinamento da escala consistiu em primeiramente selecionar os itens que fossem aprovados em 70% dos seguintes critérios: frequência de ocorrência dos itens em MA > 30% das avaliações dos 4 observadores agrupados; confiabilidade intra e interobservador >60% para pelo menos dois avaliadores; responsividade (aumento do escore no momento dor em relação ao basal), itens com auto valor $\geq 0,5$ ou $\leq 0,5$ pela análise de associação múltipla, correlação item-total >0,3 em MA, consistência interna > 0,7 em MA, especificidade > 70%, sensibilidade > 70% e padrão de ocorrência ao

longo do dia semelhante para manhã, tarde e noite. O item atenção à área afetada foi excluído da escala por não cumprir aos critérios de associação múltipla, correlação item-total, consistência interna e sensibilidade (Apêndice E).

Os subitens dos itens aprovados foram refinados segundo ao menos dois dos seguintes critérios: padrão de ocorrência ao longo do dia semelhante para manhã, tarde e noite; frequência de ocorrência em MA para as avaliações dos 4 observadores agrupados > 50 pontuações; confiabilidade intraobservador e confiabilidade interobservadores >60% para ao menos dois avaliadores, e itens com auto valor $\geq 0,5$ ou $\leq 0,5$ pela análise de associação múltipla. O subitem *apresenta espasmos da pele do dorso*, proveniente do item *miscelânea de comportamentos*, foi excluído pois não apresentou nenhum dos critérios de refinamento (Apêndice F). Apesar da aprovação matemática, o subitem *se desloca lentamente* (relativo ao item Postura) foi excluído pois era antagônico ao subitem *se desloca normalmente e/ou salta*, não havendo ocorrência destes dois subitens concomitantemente.

Desta forma, a escala definitiva pós-refinamento apresentou 5 itens de escores 0 a 2 com somatória total de 0 a 10 (Tabela 4).

Tabela 4 – Versão final da escala comportamental para avaliar a dor aguda pós-operatória em coelhos (RPBS) após o refinamento.

1. POSTURA
A) se desloca normalmente e/ou salta
B) apresenta posição bipedal ou quadrupedal
C) fica deitado com abdômen em contato com o piso na maior parte do tempo
D) não se desloca durante a maior parte do tempo
(0) presença do estado A e/ou B apenas*
(1) presença do estado C ou D
(2) presença dos estados C e D
*A pontuação só será 0 quando não houver nem o comportamento C nem o D.
2. ATIVIDADE
A) se movimenta normalmente e/ou quando parado exerce atividade normal*
B) pouco se movimenta** e não exerce atividade normal
C) está imóvel e não exerce atividade normal
(0) presença do estado A
(1) presença do estado B
(2) presença do estado C
*interage com objetos de enriquecimento ambiental (pinha, brinquedos ou outros) comer, beber água, cavar maravalha, comportamento de auto-limpeza, farejar

**altera postura, apresenta movimentos de cabeça e pescoço
3) INTERAÇÃO E APETITE
A) interage com objetos de enriquecimento ambiental*
B) come**
C) fareja o ambiente e está curioso
D) apresenta comportamento de auto-limpeza, exceto o local da cirurgia
(0) o coelho apresenta mais de um comportamento
(1) o coelho apresenta um comportamento
(2) o coelho não apresenta nenhum comportamento
* pinha, brinquedo ou outros.
** ração, legumes, verduras ou petisco.
4) EXPRESSÃO FACIAL
A) mantém olhos bem abertos e as orelhas eretas durante todo o tempo
B) apresenta olhos semicerrados ou fechados*
C) apresenta orelhas fletidas*
(0) o coelho apresenta a expressão A
(1) o coelho apresenta as expressões B ou C
(2) o coelho apresenta as expressões B e C
*em algum momento .
Não considerar piscar como olhos semi-cerrados ou fechados.
5) MISCELÂNEA DE COMPORTAMENTOS
A) faz menção de se levantar, porém permanece deitado
B) apresenta movimento rápido dorsal do corpo
C) se retrai e fecha os olhos
D) apresenta tremores*
(0) o coelho não apresenta nenhum comportamento
(1) o coelho apresenta um comportamento
(2) o coelho apresenta mais que um comportamento
*mais facilmente observados na cabeça e orelhas

Associação múltipla

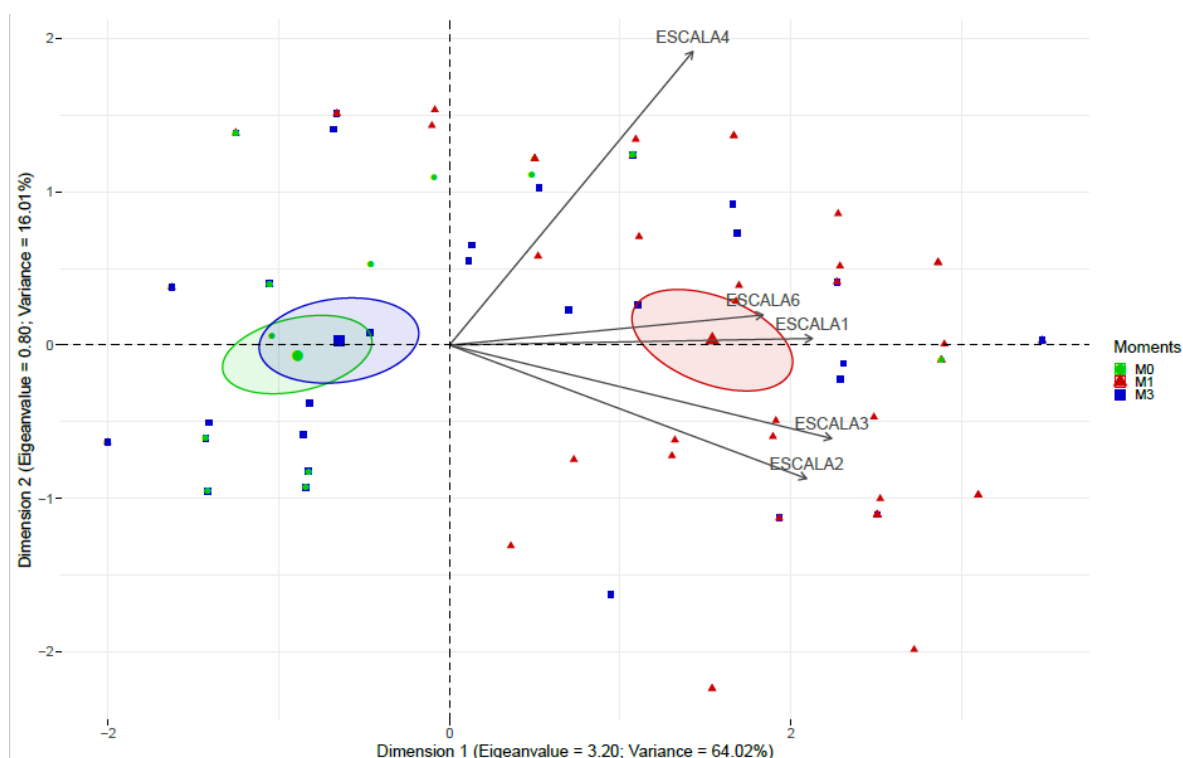
A análise de componentes principais detectou apenas uma dimensão representativa com autovalor > 1 e variância > 20 (Tabela 5 e Figura 3). Todos os itens da escala apresentaram valor de carga significativo nesta dimensão.

Tabela 5 – Valores de carga de cada item da escala comportamental para avaliar a dor aguda pós-operatória em coelhos (RPBS) baseada na análise de componentes principais.

Item	Dimensão 1	Dimensão 2
Postura	0,87	0,02
Atividade	0,85	-0,35
Interação e apetite	0,91	-0,25
Expressão facial	0,58	0,78
Miscelânea de comportamentos	0,75	0,08
Autovalor	3,2	0,8
Variância	64,02%	16,01%

Os valores de carga em negrito representam os itens da escala que contribuem para cada dimensão e estão associados entre si (valor de carga $\geq 0,5$ ou $\leq -0,5$).

Figura 3 – Biplot da análise de componentes principais com os itens da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).



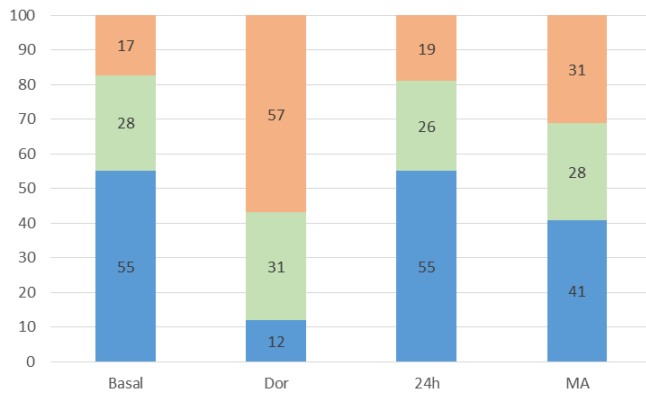
As elipses representam a concentração dos animais em cada momento: basal - verde; dor – vermelha; 24h - azul. Escala 1 corresponde à postura, Escala 2 à atividade, Escala 3 à interação e apetite, Escala 4 à expressão facial e Escala 6 à miscelânea de comportamentos. A elipse correspondente ao momento de maior dor (vermelha) está posicionada no quadrante direito, para onde também se direcionam os vetores dos itens 1, 2, 3 e 6 da escala. O item 4 se distancia um pouco deste concentrado de itens. As elipses correspondentes aos momentos basal e 24h posicionam-se no quadrante oposto.

Distribuição de escores

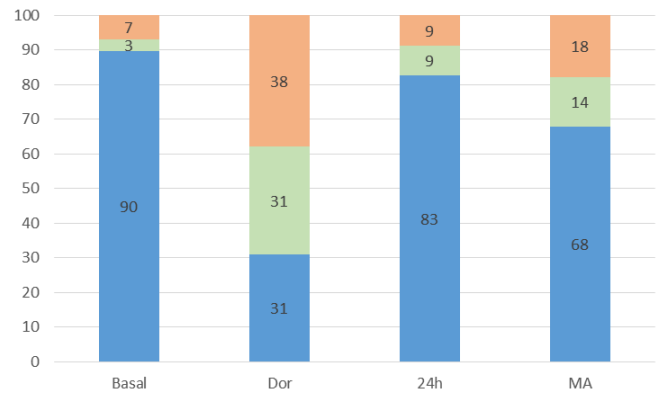
O escore 0 foi predominante no momento basal para todos os itens da escala (Figura 4) e o escore 2 foi maior no momento dor, em todos os itens (Figura 4 A-D), exceto para miscelânea de comportamentos (Figura 4E), em que predominou-se o escore 1.

Figura 4 - Distribuição em porcentagem dos escores (0, 1 ou 2) de cada item da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).

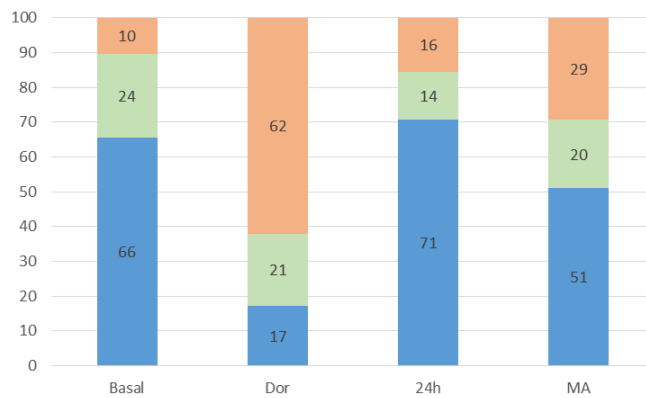
Postura



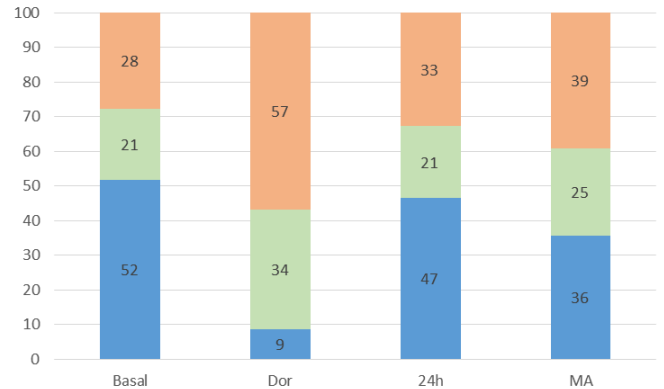
Atividade



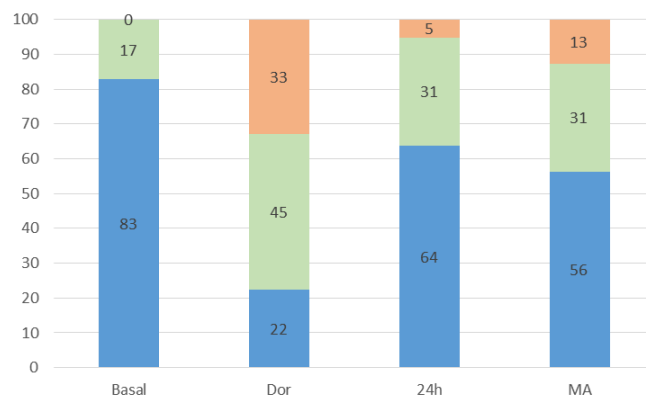
Interação e apetite



Expressão facial



Miscelânea de comportamentos



Momento basal: sem dor, antes da cirurgia; momento dor: maior dor esperada após a cirurgia; momento 24h: aproximadamente um dia após a cirurgia; MA: todos os momentos agrupados.

Seleção de avaliadores

Selecionaram-se todos os avaliadores submetidos ao treinamento para avaliação oficial pois apresentaram confiabilidade intraobservador (repetibilidade) boa ou muito boa em todos os itens da escala, com exceção da miscelânea de comportamentos para os avaliadores 2 e 4. Tais avaliadores receberam novas instruções à respeito deste item e seus subitens para aprimorarem suas avaliações.

Confiabilidade intraobservador

A confiabilidade intraobservador (repetibilidade) foi boa ou muito boa (0,63-0,97) para todos os itens da RPBS, para sua somatória total (0,94-0,98) e para as outras escalas avaliadas (0,65-0,93), com exceção da miscelânea de comportamentos para o avaliador 2, que foi moderada (0,53) (Tabela 6).

Tabela 6 – Confiabilidade intraobservador (repetibilidade) da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS), da indicação de resgate analgésico e das escalas unidimensionais de acordo com os coeficientes kappa ponderado (k_w) e de correlação intraclasse (ICC).

Avaliador	Avaliador 1 (Padrão-ouro)	Avaliador 2	Avaliador 3	Avaliador 4
Itens da RPBS	k_w (mínimo-máximo)			
Postura	0,95 (0,92-0,97)	0,89 (0,83-0,94)	0,87 (0,83-0,92)	0,82 (0,77-0,86)
Atividade	0,96 (0,96-0,96)	0,91 (0,91-0,91)	0,85 (0,85-0,85)	0,82 (0,82-0,82)
Interação e apetite	0,97 (0,95-0,99)	0,95 (0,95-0,95)	0,96 (0,94-0,98)	0,86 (0,86-0,86)
Expressão facial	0,93 (0,90-0,96)	0,86 (0,80-0,91)	0,75 (0,67-0,82)	0,84 (0,80-0,89)
Miscelânea de comportamentos	0,85 (0,82-0,87)	0,53 (0,42-0,63)	0,65 (0,65-0,65)	0,77 (0,71-0,82)
Indicação de resgate	0,87 (0,80-0,95)	0,83 (0,75-0,92)	0,63 (0,50-0,76)	0,79 (0,70-0,89)
EN	0,85 (0,85-0,85)	0,93 (0,93-0,93)	0,84 (0,84-0,84)	0,83 (0,83-0,83)
EDS	0,82 (0,82-0,82)	0,90 (0,87-0,93)	0,84 (0,79-0,89)	0,65 (0,65-0,65)
	ICC (intervalo de confiança)			
EAV	0,83 (0,78-0,87)	0,93 (0,91-0,95)	0,86 (0,81-0,89)	0,81 (0,75-0,85)

Somatória total da RPBS	0,98 (0,98-0,99)	0,94 (0,91-0,95)	0,95 (0,93-0,96)	0,94 (0,92-0,95)
--------------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

Resgate: resposta do avaliador se recomendaria ou não resgate analgésico ao final da observação de cada vídeo; EN: escala numérica; EDS: escala descritiva simples; EAV: escala analógica visual; RPBS: escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos. Interpretação do grau de confiabilidade k_w ou ICC: muito boa: 0,81-1,0; boa: 0,61-0,80; moderada: 0,41-0,6; razoável: 0,21-0,4; pobre < 0,2 (ALTMAN, 1991). Destacam-se em negrito os valores que se enquadram em confiabilidade boa e muito boa (> 0,61).

Determinação do avaliador padrão-ouro

Após as duas avaliações oficiais, determinou-se o avaliador 1 como padrão-ouro por apresentar a maior confiabilidade intraobservador (Tabela 7) e a maior coerência quanto à resposta se faria resgate analgésico no momento basal (não esperado) e no momento de dor (esperado) (Tabela 7).

Tabela 7 - Coerência para recomendação de resgate analgésico nos momentos basal e de dor

	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 3	Avaliador 4
Resgates Dor	56	55	56	57
Resgates Basal	10	23	22	20
COE	46	31	34	37

COE= *Resgates Dor* – *Resgates Basal*. COE: coerência; Resgate Dor = resgates analgésicos recomendados no momento de dor; Resgates Basal: resgates analgésicos recomendados no momento basal, ou seja, sem dor. Total de animais: 58. Destaca-se em negrito o maior valor de coerência.

Reprodutibilidade e correlação de matriz

A confiabilidade entre o avaliador padrão-ouro e os demais, foi boa ou muito boa para todos os itens (0,64-0,96), com exceção da miscelânea de comportamentos, em que foi moderada (0,52-0,56) (Tabela 8). A confiabilidade

interobservador (reprodutibilidade) das escalas EN, EDS e EAV foram de boa a muito boa (0,66-0,84)(Tabela 8) e a da somatória total da RPBS foi muito boa entre todos os avaliadores (0,88-0,93)(Tabela 9).

Tabela 8 - Confiabilidade interobservador (reprodutibilidade) da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS), da indicação de resgate analgésico e das escalas unidimensionais de acordo com os coeficientes kappa ponderado (k_w) e de correlação intraclassa (ICC).

Padrão-ouro (Avaliador 1) vs:	Avaliador 2	Avaliador 3	Avaliador 4
Itens da RPBS	k_w (mín-máx)		
Postura	0,86 (0,81-0,91)	0,88 (0,83-0,92)	0,84 (0,80-0,89)
Atividade	0,89 (0,89-0,89)	0,72 (0,66-0,79)	0,80 (0,80-0,80)
Interação e apetite	0,95 (0,95-0,95)	0,96 (0,94-0,98)	0,88 (0,85-0,91)
Expressão facial	0,82 (0,75-0,89)	0,70 (0,62-0,79)	0,69 (0,61-0,77)
Miscelânea de comportamentos	0,52 (0,41-0,64)	0,56 (0,45-0,67)	0,64 (0,55-0,73)
Indicação de resgate	0,67 (0,56-0,78)	0,62 (0,50-0,73)	0,70 (0,60-0,81)
EN	0,84 (0,84-0,84)	0,71 (0,71-0,71)	0,63 (0,63-0,63)
EDS	0,67 (0,55-0,78)	0,62 (0,49-0,75)	0,62 (0,47-0,76)
	ICC (intervalo de confiança)		
EAV	0,78 (0,71-0,83)	0,69 (0,60-0,76)	0,64 (0,54-0,72)
Somatória total da RPBS	0,93 (0,91-0,95)	0,92 (0,89-0,94)	0,92 (0,90-0,94)

EN: escala numérica; EDS: escala descritiva simples; EAV: escala analógica visual; RPBS: Escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos. Grau de confiabilidade k_w ou ICC - muito boa: 0,81-1,0; boa: 0,61-0,80; moderada: 0,41-0,6; razoável: 0,21-0,4; pobre <0,2 (ALTMAN, 1991). Destacam-se em negrito os valores que se enquadram em confiabilidade boa e muito boa (> 0,61).

Tabela 9 – Matriz de confiabilidade entre todos os observadores referente a somatória da escala comportamental para avaliar a dor em coelhos (RPBS) de acordo com o coeficiente de correlação intraclassa (ICC).

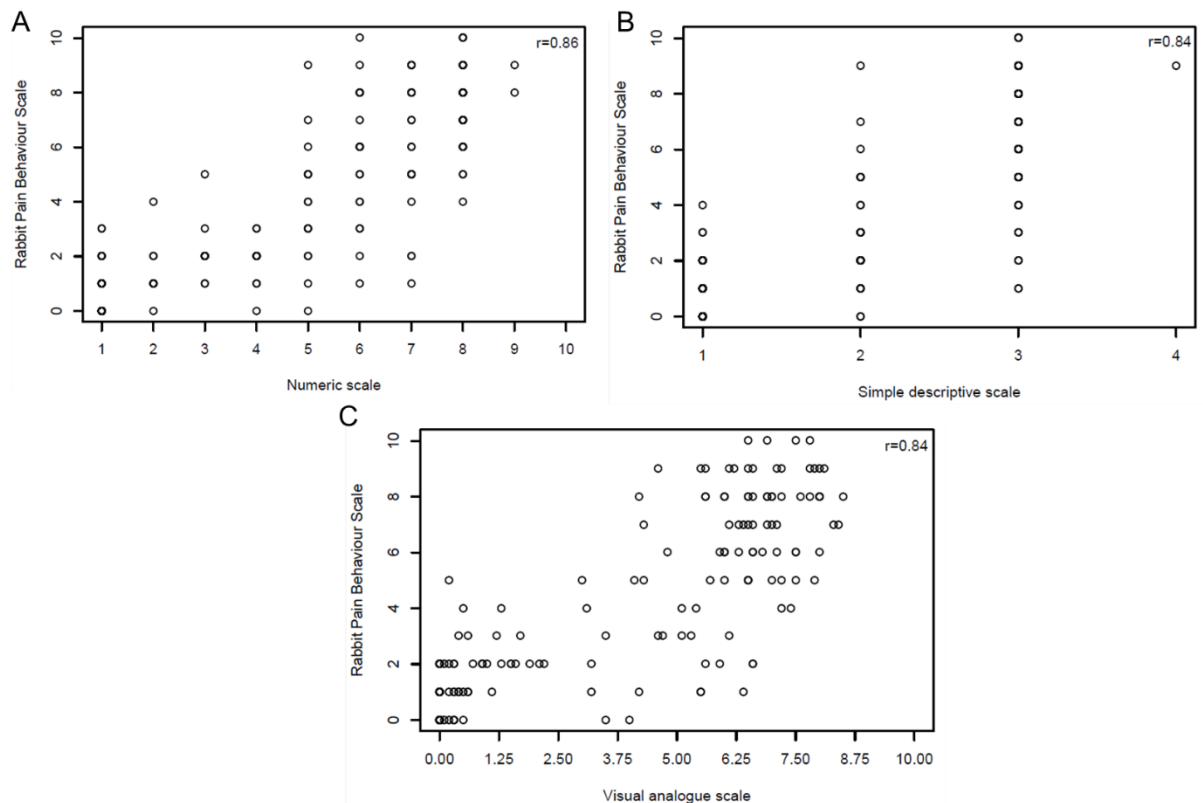
	Avaliador 1 (Padrão-ouro)	Avaliador 2	Avaliador 3
Avaliador 2	0,93 (0,91-0,95)		
Avaliador 3	0,92 (0,89-0,94)	0,88 (0,84-0,91)	
Avaliador 4	0,92 (0,90-0,94)	0,91 (0,88-0,93)	0,89 (0,86-0,92)

Grau de confiabilidade ICC: muito boa: 0,81-1,0; boa: 0,61-0,80; moderada: 0,41-0,6; razoável: 0,21-0,4; pobre <0,2 (ALTMAN, 1991).

Validade de critério concorrente

Observou-se alta correlação entre a somatória da escala proposta e as escalas numérica (EN) ($r_s = 0,86$), descritiva simples (EDS) ($r_s = 0,84$) e analógica visual (EAV) ($r_s = 0,84$) (Figura 5).

Figura 5 - Correlação dos postos de Spearman entre somatória total da escala comportamental para avaliar a dor em coelhos (RPBS) com as escalas unidimensionais.

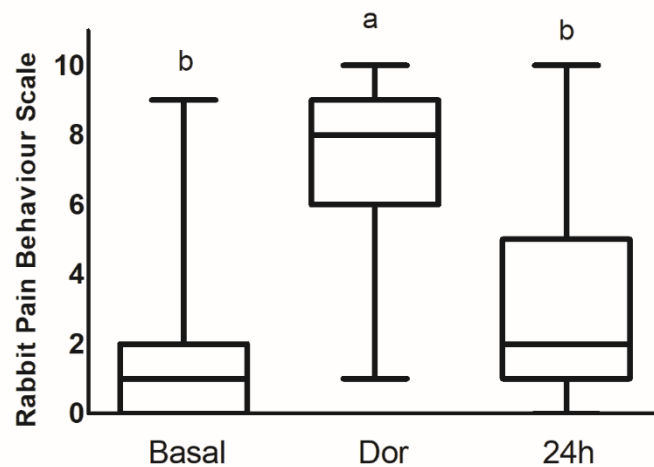


A) Escala numérica (EN); B) escala descritiva simples (EDS) e C) escala analógica visual (EAV).

Validade de constructo (responsividade)

Ao comparar-se agrupadamente os grupos ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox entre os momentos basal, dor e 24h, observou-se aumento na somatória total após a cirurgia (dor) e retorno aos valores basais após 24 horas (Figura 6).

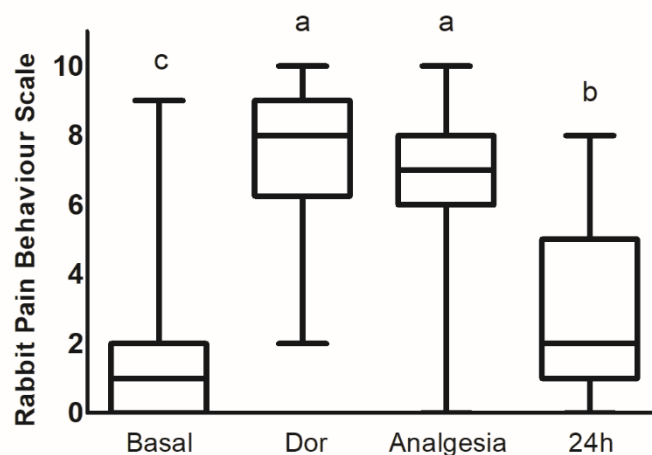
Figura 6 - Gráfico de caixas da somatória total da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) dos grupos ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox agrupados.



Basal: momento sem dor, antes da cirurgia; Dor: após a cirurgia, momento de maior dor esperada; 24h: aproximadamente 24 horas após a cirurgia. Utilizaram-se os grupos ORTO, ORQ-Melox e OSH-Pla por serem os grupos que biologicamente representam menor efeito do protocolo analgésico e, portanto, apresentam maior dor. Letras diferentes expressam diferença estatística pelo teste de Friedman ($p < 0,05$), sendo $a > b$.

Quando se comparou os momentos do grupo ORTO isolado, a somatória total foi maior em dor e após resgate analgésico quando comparados ao basal e foi intermediária às 24 horas (Figura 7).

Figura 7 - Gráfico de caixas da somatória total da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) do grupo ORTO.



Basal: momento sem dor, antes da cirurgia; Dor: 1h após a cirurgia, momento de maior dor; Analgesia: 3 horas após o resgate analgésico; 24h: 24 horas após a cirurgia. Letras diferentes expressam diferença estatística pelo teste de Friedman ($p < 0,05$), no qual $a > b > c$.

Pela análise da responsividade dos grupos ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox agrupados, os escores de todos os itens foram maiores na dor com relação ao basal. Com exceção do item postura que foi maior 24h comparado ao basal, não houve diferença dos outros itens entre o basal e 24h (Tabela 10).

Tabela 10 – Responsividade de cada um dos itens, da somatória da RPBS, das escalas EN, EDS, EAV e recomendação para resgate analgésico [mediana (amplitude)] para os grupos ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox agrupadamente.

Item	Basal	Dor	24h
Postura	0 (0-2) ^c	2 (0-2) ^a	1 (0-2) ^b
Atividade	0 (0-2) ^b	2 (0-2) ^a	0 (0-2) ^b
Interação e apetite	0 (0-2) ^b	2 (0-2) ^a	0 (0-2) ^b
Expressão facial	0 (0-2) ^b	1 (0-2) ^a	1 (0-2) ^b
Miscelânea de comportamentos	0 (0-1) ^b	1 (0-1) ^a	0 (0-2) ^b
Somatória total da RPBS	0 (1-9) ^b	8 (1-10) ^a	2 (0-10) ^b
Resgate	0 (0-1) ^b	1 (1-1) ^a	1 (0-1) ^b
EN	1 (1-7) ^c	7 (2-9) ^a	5 (1-8) ^b
EDS	1 (1-3) ^c	3 (1-3) ^a	2 (1-3) ^b
EAV	0 (0-7,1) ^c	6,6 (0,6-8,5) ^a	4 (0-8,4) ^b

Basal: momento sem dor, antes da cirurgia; Dor: após a cirurgia, momento de maior dor esperada; 24h: aproximadamente 24 horas após a cirurgia. EN: escala numérica; EDS: escala descritiva simples; EAV: escala analógica visual; Resgate: recomendação para resgate analgésico. Letras diferentes expressam diferença estatística pelo teste de Friedman ($p < 0,05$) sendo ^a>^b>^c. Itens da escala: 0-2; Somatória total da RPBS: 0-10; Resgate: 0 (não recomendaria resgate analgésico) ou 1 (recomendaria resgate analgésico).

Ao se avaliar a responsividade apenas para o grupo ORTO isoladamente, os escores foram maiores nos momentos dor e analgesia quando comparados aos momentos basal e 24h para todos os itens exceto expressão facial que foi maior apenas no momento dor em comparação ao basal (Tabela 11). Nenhuma escala apresentou responsividade para o resgate analgésico.

Tabela 11 - Responsividade de cada um dos itens, da somatória da RPBS, das escalas EN, EDS, EAV e recomendação para resgate analgésico [mediana (amplitude)] para o grupo ORTO isoladamente.

Item	Basal	Dor	Analgesia	24h
Postura	0 (0-2) ^b	2 (1-2) ^a	2 (0-2) ^a	1 (0-2) ^b
Atividade	0 (0-2) ^b	2 (0-2) ^a	2 (0-2) ^a	0 (0-2) ^b
Interação e apetite	0 (0-2) ^b	2 (0-2) ^a	2 (0-2) ^a	0 (0-2) ^b
Expressão facial	0 (0-2) ^b	1 (0-1) ^a	1 (0-2) ^{ab}	1 (0-2) ^{ab}
Miscelânea de comportamentos	0 (0-1) ^c	1 (0-2) ^a	1 (0-2) ^{ab}	1 (0-2) ^{bc}
Total RPBS	0 (1-9) ^c	8 (2-10) ^a	7 (0-10) ^a	2 (0-8) ^b
Resgate	0 (0-1) ^b	1 (1-1) ^a	1 (0-1) ^a	1 (0-1) ^a
EN	1 (1-7) ^c	8 (5-9) ^a	7 (2-9) ^{ab}	5 (1-8) ^b
EDS	1 (1-3) ^b	3 (2-3) ^a	3 (1-3) ^a	3 (1-3) ^a
EAV	0 (0-6) ^b	6,8 (4,2-8,5) ^a	6,7 (0,6-8,9) ^a	4,7 (0-8) ^a

Basal: momento sem dor, antes da cirurgia; Dor: após a cirurgia, momento de maior dor esperada; Analgesia: 3 horas após o resgate analgésico com morfina 2mg/kg e meloxicam 1mg/kg (IM); 24h aproximadamente 24 horas após a cirurgia. RPBS: escala proposta; EN (escala numérica), EDS (escala descritiva simples); EAV (escala analógica visual) ; Resgate: recomendação para resgate analgésico. Letras diferentes expressam diferença estatística pelo teste de Friedman ($p < 0,05$) ^{a>b>c}. Itens da escala: 0-2; Total da escala: 0-10; Resgate: 0 (não recomendaria resgate analgésico) ou 1 (recomendaria resgate analgésico).

Correlação item-total e consistência interna

A correlação item-total para somatória de todos os momentos variou de 0,69 a 0,86. Todos os itens foram aceitos pois apresentaram coeficiente de correlação $> 0,3$. A consistência interna da escala foi excelente (coeficiente α de Crombach $> 0,80$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Correlação item-total (coeficiente de correlação de postos de spearman - r_s) e consistência interna (α de Crombach) da escala comportamental para avaliar dor aguda em coelhos (RPBS).

Item	Correlação item-total	Consistência interna
Total RPBS	--	0,85
Excluindo cada um dos itens abaixo:		
Postura	0,75	0,79
Atividade	0,72	0,81
Interação e apetite	0,78	0,78
Expressão facial	0,45	0,88
Miscelânea de comportamentos	0,61	0,85

MA: basal+dor+24h. Interpretação do r_s : valores adequados 0,3-0,7 (STREINER; NORMAN, 2016) - aceitaram-se os itens $>0,3$. Interpretação do α de Crombach: 0,60-0,64 - minimamente aceitável; 0,65-0,69 - aceitável; 0,70-0,74 - boa; 0,75-0,80 - muito boa; $>0,80$ - excelente. Destacam-se em negrito os valores aceitáveis.

Especificidade e sensibilidade

A atividade apresentou boa especificidade (89,7%) e a miscelânea de comportamentos especificidade moderada (82,8%). Os outros itens não foram específicos (51,5 - 65,5%). A sensibilidade foi boa a excelente para postura, interação e apetite e expressão facial ($> 88\%$). A atividade e miscelânea de comportamentos apresentaram sensibilidade moderada ($>81\%$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Especificidade e sensibilidade em porcentagem de cada item da escala comportamental para avaliar a dor em coelhos (RPBS) em coelhos submetidos à cirurgias ortopédicas e tecidos moles agrupados.

ITEM	Especificidade (%) no momento basal	Sensibilidade (%) no momento dor
Postura	51,7	95,3
Atividade	89,7	81,4
Interação e apetite	65,5	88,4
Expressão facial	51,7	90,7
Miscelânea de comportamentos	82,8	81,4

Especificidade = $VN/VN+FP$, onde VN = número de verdadeiros negativos (escore 0), FP = falsos positivos (escores 1 e 2) no momento basal com **todos os grupos de cirurgias agrupados**. A especificidade foi classificada como excelente (95-100%), boa (85-94,9%), moderada (70-84,9%) ou não específica (<70%). Sensibilidade = $VP/VP+FN$, onde VP = verdadeiros positivos (escores 1 e 2), FN = falsos negativos (escore 0) no momento de maior dor para os grupos de cirurgia: **ORTO, OSH-Pla e ORQ-Melox**. Utilizaram-se os grupos ORTO, ORQ-Melox e OSH-Pla por serem os grupos que biologicamente representam menor efeito do protocolo analgésico e, portanto, apresentam maior dor. A sensibilidade foi classificada como excelente (95-100%), boa (85-94,9%), moderada (70-84,9%) ou não sensível (<70%). Em negrito estão os itens considerados sensíveis e específicos.

Quando cada grupo foi avaliado isoladamente, a especificidade variou de moderada a boa para ORTO; de não específica a boa para OSH e de não específica a excelente para a orquiectomia. A sensibilidade variou entre boa a excelente ORTO, boa a excelente para OSH-Pla, com excessão da miscelânea de comportamentos que foi moderada; de boa a excelente para o OSH-Melox, com excessão da atividade que foi moderada; moderada a excelente para ORQ-Multi, com excessão da atividade e interação e apetite que foram não sensíveis e para ORQ-Multi, o único item que apresentou sensibilidade foi a expressão facial, considerada boa (Tabela 14).

Tabela 14 - Especificidade e sensibilidade em porcentagem de cada item da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) em cada um dos grupos isoladamente

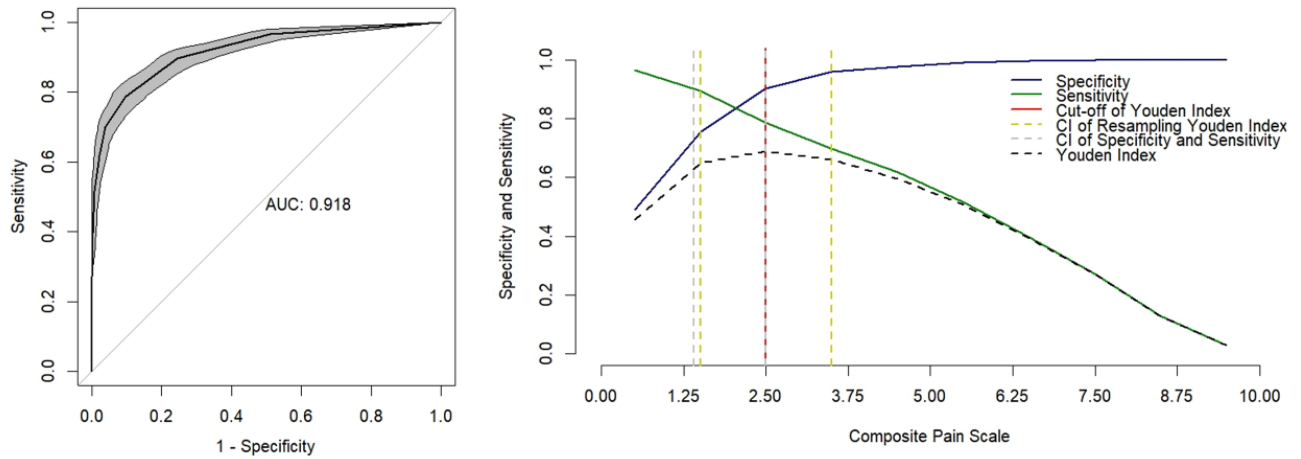
	Grupos experimentais									
	Orto		OSH-Pla		OSH-Melox		ORQ-Melox		ORQ-Multi	
Item da RPBS	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
Postura	54	100	14	100	29	100	75	75	75	50
Atividade	93	93	86	86	71	71	87	38	100	0
Interação e apetite	71	96	43	100	43	100	75	50	75	38
Expressão facial	71	86	0	100	14	100	37	100	75	88
Miscelânea de comportamentos	89	86	86	71	57	86	75	75	87	50

Especificidade = $VN/VN+FP$, onde VN = número de verdadeiros negativos (escore 0), FP = falsos positivos (escores 1 e 2) no momento basal em cada um dos grupos de cirurgias. A especificidade foi classificada como excelente (95-100%), boa (85-94,9%), moderada (70-84,9%) ou não específica (<70%). Sensibilidade = $VP/VP+FN$, onde VP = verdadeiros positivos (escores 1 e 2), FN = falsos negativos (escore 0) no momento de maior dor em cada um dos grupos de cirurgia. A sensibilidade foi classificada como excelente (95-100%), boa (85-94,9%), moderada (70-84,9%) ou não sensível (<70%).

Determinação do ponto de corte para a RPBS

O ponto de corte para discernir coelhos com dor daqueles sem dor foi determinado pelo índice de Youden, que foi de ≥ 4 para o avaliador padrão-ouro; ≥ 2 para os avaliadores 2 e 4 e ≥ 3 para o avaliador 3 (Apêndice G) e o conjunto de todos avaliadores (Figura 8). A zona de incerteza diagnóstica abrangeu os escores 2, 3 e 4. Desta forma o ponto de corte para o resgate analgésico definido pela avaliação de todos avaliadores juntos foi de ≥ 3 para a RPBS. Os valores da área sob a curva foram maiores que 0,90 para todos os avaliadores, o que demonstra uma excelente capacidade discriminatória da RPBS (Tabela 15).

Figura 8 - Curva ROC, área sob a curva e zona de incerteza diagnóstica para todos os avaliadores agrupados.



À esquerda: curva de característica da operação do receptor (ROC) com intervalo de confiança (IC) de 95% calculada a partir de 1.001 reamostragens. À direita: dois gráficos da curva ROC representando a especificidade, a sensibilidade, o índice de Youden, o ponto de corte, o intervalo de confiança (IC) de 1.001 reamostragens e os pontos com sensibilidade e especificidade >0,90.

Tabela 15 – A) Especificidade, sensibilidade e índice de Youden de cada avaliador e todos os avaliadores juntos para cada escore da escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS); B) Intervalos de confiança (IC) de 95% do índice de 1.001 reamostragens e sensibilidade e especificidade > 90% para estimar a zona de incerteza diagnóstica do ponto de corte de cada avaliador e todos os avaliadores juntos de acordo com o índice de Youden.

A	Avaliador 1 (Padrão-ouro)			Avaliador 2			Avaliador 3			Avaliador 4			Todos avaliadores		
Escore	E	S	YI	E	S	YI	E	S	YI	E	S	YI	E	S	YI
0	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
1	0,42	0,98	0,40	0,53	0,98	0,51	0,26	0,98	0,24	0,73	0,92	0,65	0,49	0,97	0,46
2	0,65	0,93	0,58	0,82	0,88	0,71	0,69	0,93	0,62	0,87	0,84	0,71	0,75	0,90	0,65
3	0,90	0,84	0,74	0,94	0,75	0,69	0,83	0,80	0,63	0,94	0,76	0,69	0,90	0,79	0,69
4	0,96	0,79	0,75	1,00	0,63	0,63	0,91	0,71	0,62	0,97	0,68	0,65	0,96	0,70	0,66
5	0,97	0,73	0,70	1,00	0,55	0,55	0,94	0,61	0,55	0,98	0,60	0,59	0,98	0,62	0,60
6	1,00	0,61	0,61	1,00	0,46	0,46	0,96	0,50	0,46	1,00	0,50	0,50	0,99	0,51	0,51
7	1,00	0,49	0,49	1,00	0,34	0,34	0,98	0,37	0,35	1,00	0,41	0,41	1,00	0,40	0,39
8	1,00	0,38	0,38	1,00	0,22	0,22	1,00	0,21	0,21	1,00	0,30	0,30	1,00	0,27	0,27
9	1,00	0,18	0,18	1,00	0,07	0,07	1,00	0,10	0,10	1,00	0,17	0,17	1,00	0,13	0,13
10	1,00	0,04	0,04	1,00	0,00	0,00	1,00	0,02	0,02	1,00	0,05	0,05	1,00	0,03	0,03
		IC			IC			IC			IC			IC	
B	Estimado	Mín.	Máx.	Estimado	Mín.	Máx.	Estimado	Mín.	Máx.	Estimado	Mín.	Máx.	Estimado	Mín.	Máx.
IY	3,5	2,5	3,5	1,5	1,5	3,5	2,5	1,5	3,5	1,5	0,5	3,5	2,5	1,5	3,5
IC >0,90	N/A	1,8	2,55	N/A	1,3	2,2	N/A	1,75	3,4	N/A	0,7	2	N/A	1,4	2,5
ASC	0,93	0,90	0,97	0,94	0,90	0,97	0,90	0,85	0,95	0,92	0,88	0,96	0,92	0,88	0,96

E: especificidade; S: sensibilidade; IY: índice Youden; IC: intervalo de confiança; ASC: área sob a curva. A) Em destaque os pontos de corte determinados para cada avaliador e para todos os avaliadores juntos; B) Em destaque os pontos de corte determinados pela reamostragem de 1.001 vezes.

A porcentagem de animais presentes na zona de incerteza diagnóstica variou de 22 a 34% no basal, de 14 a 21% na dor e de 19 a 43% em 24h (Tabela 16).

Tabela 16 - Frequência e porcentagem de animais pontuados na zona de incerteza diagnóstica (2, 3 ou 4) de acordo com a escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS).

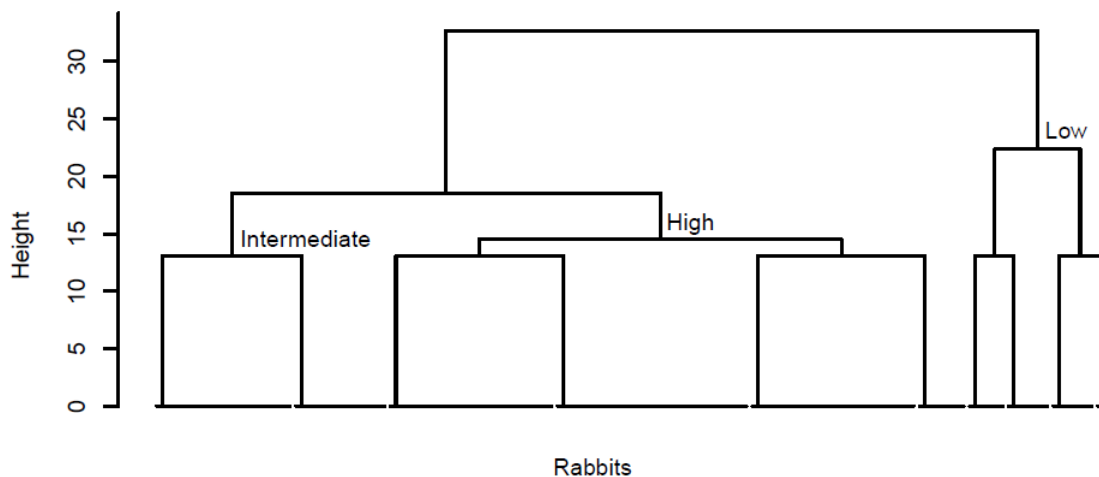
Avaliador/ Momento	Avaliador 1 (Padrão-ouro)		Avaliador 2		Avaliador 3		Avaliador 4		Todos Avaliadores	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
Basal	16	28	17	29	20	34	13	22	66	28
Dor	8	14	12	21	8	14	9	16	37	16
24h	20	34	19	33	25	43	11	19	75	32
MA	44	25	48	28	53	30	33	19	178	26

F: frequência; %: porcentagem. Total de avaliações: 174 por avaliador; Basal: antes da cirurgia; Dor: após a cirurgia, no momento esperado de maior dor; M3: aproximadamente 24 horas após a cirurgia; MA: basal+dor+24h.

Intensidade da dor

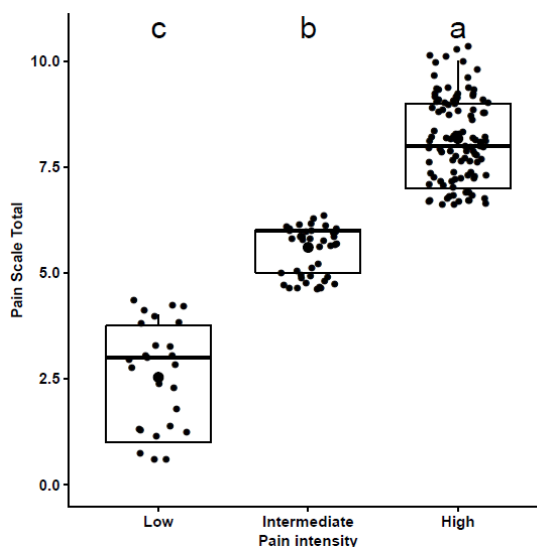
De acordo com a 2ª avaliação dos 4 avaliadores no momento dor, as somatórias totais dividiram-se em três grupos (Figura 9) de intensidade de dor dados por mediana, mínimo e máximo e nomeados de acordo com a intensidade: baixa (*low*) (3; 1 - 4); intermediária (*intermediate*) (6; 5 - 6) e alta (*high*) (8; 7 - 10) (Figura 10). A partir desta classificação, observou-se que os animais do grupo ORTO, ORQ-melox e OSH-Pla se enquadraram respectivamente 70%, 38%, 50% em intensidade alta; 19%, 25% e 46% em intensidade intermediária e 12%, 38% e 4% em intensidade baixa (Tabela 17).

Figura 9 – Dendrograma criado pela análise de agrupamento não hierárquica de acordo com a somatória total da RPBS



Formação de 3 agrupamentos que foram nomeados (low, intermediate e high) pela classificação da intensidade de dor.

Figura 10 – Gráfico de caixas para as três intensidades de dor (low, intermediate e high).



De acordo com a mediana, mínimo e máximo obtidos pela análise de agrupamento não hierárquica seguida por teste de Kruskal-Wallis, os escores dividiram-se em 3 grupos: low - intensidade baixa (3; 1 - 4); intermediate – dor intermediária (6; 5 - 6) e high - dor de intensidade alta (8; 7 - 10). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis sendo que $a > b > c$.

Tabela 17 – Distribuição da frequência e porcentagem do número de animais em cada intensidade da dor.

Cirurgia/ Intensidade da dor	ORTOPEDIA		ORQUIECTOMIA		OVH		Total	
	F	%	F	%	F	%	F	%
Baixa	13	12	12	38	1	4	26	16
Intermediária	21	19	8	25	13	46	42	24
Alta	78	70	12	38	14	50	104	60
Total	112	100	32	100	28	100	172	100

F: frequência; %: porcentagem. Agrupamento com base nos escores dos animais dos grupos ORTO, ORQ-Melox; OSH-Pla no momento de maior dor (Dor) dadas pela 2ª avaliação dos 4 avaliadores.

6. DISCUSSÃO

A RPBS apresentou validade de conteúdo, critério e constructo e confiabilidade em reconhecer e quantificar a dor pós-operatória em coelhos submetidos a diferentes tipos de cirurgia e proveu um ponto de corte para identificar a dor e embasar seu tratamento.

Este é um estudo pioneiro, tanto por validar de forma robusta uma escala de dor pós-operatória em coelhos, como por aplicá-la em três tipos diferentes tipos de cirurgia, o que contempla qualidades e intensidades diversas de dor e supre as limitações das escalas que avaliam a dor em coelhos (KEATING et al., 2012) e em outras espécies (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; TAFFAREL et al., 2015), baseadas em apenas um tipo de procedimento doloroso.

A construção do etograma na fase inicial identificou os comportamentos relevantes que aumentam ou reduzem após a cirurgia (MILLMAN, 2013), a partir da comparação do comportamento de normalidade, em que não se esperaria a ocorrência de sinais de dor (basal), com o momento de maior expressão da dor. Os comportamentos identificados no etograma dos coelhos submetidos à cirurgia ortopédica coincidiram com os descritos após a OSH (LEACH et al., 2009), além de novos comportamentos aparentemente específicos para a dor ortopédica. Alguns comportamentos como andar lentamente, pressionar o abdômen contra o chão e espasmos descritos para avaliar a dor visceral (LEACH et al., 2009), não foram identificados após a cirurgia ortopédica, mas foram incluídos na escala, para torná-la aplicável a qualquer cirurgia.

Após a seleção e descrição dos comportamentos, julgaram-se seus seus itens por especialistas para determinar a validade de conteúdo do instrumento, que avalia se cada item reflete o fenômeno que se deseja avaliar, neste caso, a dor (BOATENG et al., 2018; DEVON et al., 2007; STREINER, 2003; STREINER; NORMAN, 2016). Todos os itens da RPBS

foram aprovados pelo comitê de especialistas o que corroborou a análise do etograma e da descrição de literatura (LEACH et al., 2009).

O item atenção à área afetada, embora relevante no etograma e na validade de conteúdo, não atendeu aos critérios de análise de componentes principais, correlação item-total, consistência interna e sensibilidade, e por isso foi excluído após o refinamento da escala, o que reflete a necessidade do instrumento de avaliação ser submetido a critérios estatísticos rigorosos de refinamento para aumentar a sua capacidade discriminatória (BRONDANI; LUNA; PADOVANI, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2014; TAFFAREL et al., 2015). Apesar das escalas de avaliação de dor em cães (RIALLAND et al., 2012) e gatos (BRONDANI et al., 2013) incluírem o item atenção à área afetada, em coelhos tal item não foi importante para avaliar a dor. Por serem animais que evitam demonstrar sinais de dor (BENATO; ROONEY; MURRELL, 2019), especialmente na presença de um observador (PINHO et al., 2019), sinais menos evidentes como os comportamentos descritos no item miscelânea de comportamentos (menção de se levantar, movimento dorsal do corpo, tremores e fechar os olhos e retrair o corpo), e a redução de comportamentos normais como saltar, ficar em posição bipedal ou quadrupedal, apresentar atividade e auto-limpeza, comer, interagir e explorar o ambiente, aparentemente são mais adequados para avaliar a dor nesta espécie.

Além de selecionar os itens da escala, o treinamento e seleção dos avaliadores também são relevantes para a validação e confiabilidade do instrumento. O treinamento favorece a confiabilidade intra e interobservador e reduz a variabilidade dos dados se sua eficácia for testada antes da avaliação oficial dos comportamentos (ZHANG; LEUNG; PANG, 2019), o que corrobora com nossos resultados muito bons de confiabilidades intra e interobservadores (ALTMAN, 1991). A escala CANCRs (BANCHI et al., 2019) e a RbtGs (KEATING et al., 2012) também apresentaram reprodutibilidade muito boa, entretanto, estes estudos não avaliaram a confiabilidade intraobservador, atributo importante para determinar o grau

de desempenho do avaliador ser repetível, ou seja, sua consistência de pontuações ao longo do tempo (BOATENG et al., 2018; MCDOWELL, 2009; MEROLA; MILLS, 2016).

A repetibilidade pode ser prejudicada pela falta de familiaridade com os comportamentos descritos na escala e pela fadiga do observador (MARTIN; BATESON, 1986). Para evitar tais interferências, durante o período de treinamento e avaliação oficial, além da descrição de cada escore da escala, os avaliadores receberam vídeos de cada comportamento para familiarização. Para minimizar a fadiga, os avaliadores avaliaram os vídeos por no máximo uma hora ao dia e enviaram os resultados para o pesquisador principal do estudo semanalmente, de forma a respeitarem o tempo máximo recomendado de avaliações diárias e semanais. Pode-se inferir que estas recomendações surtiram o efeito desejado, visto os bons resultados de confiabilidade.

Para a determinação do avaliador padrão-ouro, cujos resultados da 2ª avaliação são utilizados para análises da validação da escala, empregaram-se os critérios de confiabilidade intraobservador e coerência. Considerou-se como avaliador padrão-ouro o avaliador 1, que é a pesquisadora principal deste estudo, estava presente nas filmagens do grupo ORTO e foi responsável pelas edições dos vídeos.

A validade de critério é outro atributo necessário para validar o novo instrumento de avaliação de dor. Esta análise avalia se o instrumento apresenta resultados equiparáveis a um método já consagrado para avaliar o mesmo propósito (MCDOWELL, 2006, 2009). Como não há na literatura nenhuma escala para coelhos validada com o embasamento metodológico e estatístico empregado neste estudo, comparou-se a RPBS às escalas EAV, EDS e EN, assim como descrito anteriormente em outras espécies (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; TAFFAREL et al., 2015). A RPBS apresentou alta correlação com estas escalas unidimensionais de acordo com o outro critério usado nos mesmos estudos

prévios anteriormente citados, e correlação muito boa dos avaliadores com o padrão ouro.

A alteração dos escores da escala ao longo do tempo, com aumento após a cirurgia em relação ao basal e redução após 24 horas em relação ao momento de maior dor demonstra sua responsividade. Os escores menores às 24 horas em relação ao momento de dor indicam que o instrumento também define dor de intensidade leve nas cirurgias ortopédicas. Por outro lado esperaria-se, como descrito em gatos e bovinos (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014) uma redução dos escores após o resgate analgésico em comparação ao momento de dor. De acordo com o nosso conhecimento duas possibilidades justificariam tais resultados: 1) protocolo analgésico insuficiente para uma efetiva analgesia ou 2) sedação causada pela morfina, o que poderia gerar resultados falso positivos e prejudicar a avaliação da escala. Definiu-se o momento pós-resgate analgésico em três horas após a analgesia para evitar a sedação já observada anteriormente em estudo piloto, cuja avaliação foi realizada uma hora após a analgesia. Aparentemente, mesmo três horas após pode ter ocorrido sedação residual. Tais achados se corroboram por estudos prévios em que a dose de 3 mg/kg de morfina, 50% maior que a deste estudo (2 mg/kg) reduziu a atividade de coelhos por até 5 horas (BARTER; KWIATKOWSKI, 2013). Ressalta-se portanto a necessidade de descartar o efeito residual de sedativos e anestésicos que possam reduzir a especificidade e gerar resultados falso positivos, o que acarretaria um uso desnecessário de analgésicos.

A correlação item-total estima homogeneidade da escala baseada correlação entre o escore de cada item da escala com a somatória da escala excluindo este item. Quando a correlação cai muito ao se excluir o item em pauta, significa que o item apresenta pouca correlação com a escala como um todo, daí se excluir o item para não inflacionar o valor da correção (STREINER; NORMAN, 2016). Todos os itens da RPBS apresentaram correlação adequada ($r_s > 0,3$), o que sugere que todos eles

contribuem para o escore total da escala (MCDOWELL, 2009). Já valores acima de 0,70 indicam que a escala pode ser pouco abrangente e que alguns itens podem ser apenas reiteração de outros (KLINE, 1979). Neste estudo os itens postura, atividade e interação estiverem um pouco acima desta margem.

A consistência interna determina se os itens da escala se comportam da mesma forma, aumentando ou diminuindo seus escores de forma concomitante (STREINER, 2003). A consistência interna da RPBS foi excelente. Entretanto, o aumento discreto na consistência interna ao se excluir a expressão facial demonstra sua menor relevância na escala e poderia até sugerir a sua exclusão. Todavia mesmo com sua manutenção na escala os valores do coeficiente α de Cronbach permaneceram dentro dos níveis aceitáveis.

Definiu-se a RPBS como unidimensional, embora a expressão facial apresentasse valor de carga significativa também para a segunda dimensão. Instrumentos com mais dimensões tendem a apresentar menor consistência interna pois seus itens representam diferentes aspectos do que se propõe avaliar (BRONDANI; LUNA; PADOVANI, 2011; MCDOWELL, 2009). Ainda que matematicamente a RPBS seja unidimensional, biologicamente esta avalia outras dimensões além da intensidade da dor (KIM et al., 2014), como características temporais (alteração do escore após a cirurgia) e qualitativas da dor, caracterizadas pelas dimensões sensoriais (miscelânea de comportamentos), afetivas (interação com itens motivacionais, exploração) e cognitivas (postura, apetite, atividade).

A baixa especificidade para os itens postura, interação e expressão facial ao se avaliar todos os tipos de cirurgia e protocolos analgésicos em conjunto foi uma limitação do instrumento, todavia, ao se analisar a frequência de ocorrência de cada escore, quando houve pontuação de tais itens, exceto para expressão facial, no momento basal predominou o escore 1 em contraponto ao predomínio de escore 2 no momento de maior dor, o

que demonstra uma coerência dos escores com a intensidade da dor. A especificidade destes itens melhorou para alguns grupos quando se analisou separadamente cada procedimento cirúrgico. Para a expressão facial aproximadamente 50% das avaliações representaram escore 1 ou 2 no momento basal, o que demonstra que de fato não é específico. Contudo, foi o item que apresentou a maior frequência de escores 1 e 2 na dor, o que confirma a boa sensibilidade em todos os casos, o que justifica sua manutenção.

Idealmente, uma escala deve ter alta sensibilidade e especificidade. Um teste com baixa especificidade e alta sensibilidade não é recomendável para tomada de decisão em tratar um paciente que não necessita tratamento (LALKHEN; MCCLUSKEY, 2008). Para escalas de dor, a sensibilidade é mais importante que a especificidade, visto que é preferível fornecer analgesia a pacientes sem dor do que deixar de tratar aqueles que a sentem.

Nenhum item da escala foi específico para avaliar coelhos submetidos à OSH. Tal resultado pode ser parcialmente explicado pelo fato dos animais dos grupos OSH-Pla e OSH-Melox demonstrarem menor atividade no período matinal, que correspondeu ao momento basal, assim como descrito no estudo original (LEACH et al., 2009). Neste contexto, o momento basal dos coelhos submetidos à cirurgia ortopédica também foi de manhã, mas o diferencial deste grupo foi o emprego de itens motivacionais, o que parece beneficiar a especificidade, por estimular a interação e o apetite, o que aparentemente também altera a expressão facial dado ao interesse pela pinha e cenoura. Desta forma recomenda-se para a futura aplicação da escala, o uso de itens motivacionais semelhantes. Pode-se substituir a cenoura por outros alimentos, como verduras verdes frescas e a pinha por brinquedos como blocos de madeiras ou tubos de PVC adequados para coelhos. Adicionalmente, deve-se disponibilizar o novo item motivacional no momento exato da avaliação, para despertar a curiosidade dos animais com o novo objeto,

contrariamente ao estudo da OSH (LEACH et al., 2009), em que a ração e brinquedos eram disponibilizados em tempo integral e a interação com estes itens não foi representativa durante as filmagens.

As escalas previamente desenvolvidas para avaliar a dor em coelhos (BANCHI et al., 2019; KEATING et al., 2012) não determinaram um ponto de corte para resgate analgésico. O ponto de corte estipulado pela RPBS foi ≥ 3 , com área sob a curva representativa de excelente capacidade discriminatória da escala para identificar a dor por todos os avaliadores (FISCHER; BACHMANN; JAESCHKE, 2003).

Em alternativa à dicotomizar os resultados em animais com e sem dor, estabeleceu-se a zona de incerteza diagnóstica (RAY et al., 2010), também denominada zona cinzenta, que correspondeu aos escores 2, 3 e 4. Este intervalo contempla pontuações de falsos negativos e falsos positivos.

Dentro do nosso conhecimento, até o momento as escalas que avaliam a dor em animais não classificam sua intensidade com bases em seus escores, a não ser de forma empírica (BRONDANI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; REID et al., 2007).

Os escores de 1 a 4 corresponderam a baixa intensidade de dor, o que coincide com a zona de incerteza diagnóstica. Tal achado corrobora o fato de a dor de intensidade leve ser mais difícil de diagnosticar.

Dentre as avaliações dos animais classificados como baixa intensidade de dor (1, 2, 3 e 4), prevaleceram os coelhos submetidos à orquiectomia, o que se justifica por ser um procedimento cirúrgico menos invasivo e geralmente menos doloroso que a OSH (QUARTERONE et al., 2017) e a cirurgia ortopédica (KOHN et al., 2007). Os escores 5 e 6 correspondentes a dor intermediária prevaleceram nos animais submetidos à OSH, e os escores ≥ 7 referentes à dor de alta intensidade, prevaleceram nos animais submetidos à cirurgia ortopédica, de grande invasividade (KOHN et al., 2007). Contrariando as expectativas, alguns animais submetidos à orquiectomia apresentaram escores compatíveis de dor

intensa, embora se considere esta cirurgia causadora de dor leve a moderada (KOHN et al., 2007). Por outro lado alguns animais do grupo da ortopedia apresentaram escores compatíveis com dor de baixa intensidade. Tais achados reforçam a importância de aplicar escalas validadas ao se quantificar a dor, já que esta é uma experiência individual (FILLINGIM, 2017), que não deve ser generalizada de acordo com o grau de invasividade cirúrgica. A possibilidade de se avaliar e quantificar a dor individualmente garante o tratamento adequado à sua intensidade, com melhor seleção de fármacos e doses (ANIL et al., 2002; KOHN et al., 2007).

Pode-se imputar algumas limitações ao estudo. As filmagens originais apresentavam durações diferentes para as três cirurgias (20 minutos para OSH, 15 para orquiectomia e 5 para ortopedia). Como todos os vídeos foram editados e padronizados para 2 a 3 minutos, de forma a representar seus vídeos originais, é possível que se tenha favorecido avaliar os comportamentos nos vídeos dos animais submetidos a OSH e orquiectomia. Uma outra limitação foi não padronizar a implementação de itens motivacionais no momento de avaliação em todos os tipos de cirurgia. Tal fato aparentemente favoreceu os dados de especificidade no grupo ORTO. Uma terceira limitação foi que a RPBS foi validada para coelhos de laboratório saudáveis, o que requer a validação clínica da escala para avaliar a dor em coelhos de estimação de diferentes raças, idades e sob diferentes condições de saúde, como descrito para a escala CANCRs (BANCHI et al., 2019). Uma quarta limitação foi que os avaliadores passaram por treinamento e, desta forma estudos futuros poderiam investigar a RPBS analisada por avaliadores inexperientes e sem treinamento prévio, já que neste estudo os avaliadores possuíam a mesma formação e tempo de experiência semelhante. Tal consideração ressalta que os futuros avaliadores que usem a RPBS realizem treinamento prévio para garantir a fidedignidade e validade dos resultados. Como os coelhos são modelos experimentais para diversos campos da ciência, a aplicação da escala pode beneficiar a avaliação de diversos profissionais como

biólogos, médicos, biomédicos, técnicos de laboratório, entre outros; desta forma necessita-se estudos para que profissionais de outras formações apliquem o instrumento.

A RPBS foi uma ferramenta eficaz e prática para avaliar a dor em tempo real sem necessidade de equipamento, já que os vídeos do grupo ORTO corresponderam às filmagens realizadas na presença da pesquisadora principal. A definição de uma pontuação para instituir o resgate analgésico e a quantificação dos escores de intensidade de dor possibilitam ao avaliador eleger classes farmacológicas e doses ideais para cada indivíduo. Por ser um estudo bicêntrico, a escala demonstrou versatilidade ao ser aplicável em coelhos submetidos à diferentes tipos de alojamentos (bairros ou gaiolas), protocolos anestésicos e analgésicos e qualidade e grau de invasividade de cirurgias. Diante do êxito da validação deste instrumento, os autores recomendam que se institua a RPBS como parte do protocolo de experimentação em coelhos submetidos à experiência da dor, para melhorar o bem-estar e reduzir a negligência frequentemente observada no tratamento da dor da espécie leporina.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que após o refinamento e segundo os critério de validação, a RPBS é uma ferramenta que apresenta repetibilidade, reprodutibilidade e validades de conteúdo, critério e constructo, para avaliar a dor em coelhos submetidos a cirurgias ortopédicas e de tecidos moles. A indicação do ponto de corte para o resgate analgésico e a classificação da intensidade da dor da RPBS embasa a identificação da dor e o adequado tratamento analgésico pós-operatório em coelhos.

8. REFERÊNCIAS

AKOPOV, A. L. *et al.* Infrared fluorescent angiography during experimental trachea transplantation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 164, n. 4, p. 519–522, 2018.

ALBIÑANA-CUNNINGHAM, J. N. *et al.* Mechanical barriers and transforming growth factor beta inhibitor on epidural fibrosis in a rabbit laminectomy model. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, London, v. 13, n. 1, p. 72, 2018.

ALTMAN, D. G. Some common problems in medical research. *In*: ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall, 1991. p. 396-439.

ANIL, S. S. *et al.* Validation of a method for assessment of an acute pain in lambs. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 215–238, 2002.

ARRAS, M. *et al.* Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. **BMC Veterinary Research**, London, v. 3, p. 1–10, 2007.

BANCHI, P. *et al.* Development and validation of a multidimensional composite pain scale for Rabbit (CANCRS) in a clinical environment. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/728543>.

BARTER, L. S.; KWIATKOWSKI, A. Thermal threshold testing for evaluation of analgesics in New Zealand white rabbits. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 52, n. 1, p. 44–47, 2013.

BELSHAW, Z. *et al.* Quality of life assessment in domestic dogs: an evidence-based rapid review. **Veterinary Journal**, London, v. 206, n. 2, p. 203–212, 2015.

BENATO, L.; ROONEY, N. J.; MURRELL, J. C. Pain and analgesia in pet rabbits within the veterinary environment: a review. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 151–162, 2019.

BOATENG, G. O. *et al.* Best practices for developing and validating scales for health, social, and behavioral research: a primer. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, v. 6, p. 149, 2018. DOI 10.3389/fpubh.2018.00149.

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**, London, v. 9, p. 143, 2013.

BRONDANI, J. T.; LUNA, S.; PADOVANI, C. R. Refinement and initial validation of a multidimensional composite scale for use in assessing acute postoperative pain in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 174–183, 2011.

COHEN, J. Weighted kappa: nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. **Psychological Bulletin**, Washington, v. 70, n. 4, p. 213–220, 1968.

COULTER, C. A. *et al.* Reported analgesic administration to rabbits undergoing experimental surgical procedures. **BMC Veterinary Research**, London, v. 7, n. 12, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-12>.

CRONBACH, L. J. Coefficient alpha and the internal structure of tests. **Psychometrika**, New York, v. 6, p. 297–334, 1951. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02310555> 1951.

DALLA COSTA, E. *et al.* Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92281, 2014.

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. London: John Murray, 1873.

DE OLIVEIRA, F. A. *et al.* Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. **BMC Veterinary Research**, London, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2014.

DEVON, H. A. *et al.* A psychometric toolbox for testing validity and reliability. **Journal of Nursing Scholarship**, Hoboken, v. 39, n. 2, p. 155–164, 2007.

DEYO, R. A.; DIEHR, P.; PATRICK, D. L. Reproducibility and responsiveness of health status measures statistics and strategies for evaluation. **Controlled Clinical Trials**, New York, v. 12, n. 4, p. 142–158, 1991. Suppl.

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**, Lausanne, v. 3, p. 100, 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, Ithaca, v. 248, n. 7, p. 795–801, 2016.

DUNBAR, M. L. *et al.* Validation of a behavioral ethogram for assessing postoperative pain in Guinea pigs (*cavia porcellus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 29–34, 2016.

EVANGELISTA, M. C. *et al.* Facial expressions of pain in cats: the development and validation of a Feline Grimace Scale. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 19128, 2019.

FARNWORTH, M. J. *et al.* Potential behavioural indicators of post-operative pain in male laboratory rabbits following abdominal surgery. **Animal Welfare**, South Mimms, v. 20, n. 2, p. 225–237, 2011.

FENWICK, N.; DUFFUS, S. E. G.; GRIFFIN, G. Pain management for animals used in science: Views of scientists and veterinarians in Canada. **Animals**, Basel, v. 4, n. 3, p. 494–514, 2014.

FILLINGIM, R. B. Individual differences in pain: Understanding the mosaic that makes pain personal. **Pain**, Amsterdam, v. 158, p. S11-S18, 2017. Suppl. 1. DOI 10.1097/j.pain.0000000000000775. 2017.

FINKA, L. R. *et al.* Geometric morphometrics for the study of facial expressions in non-human animals, using the domestic cat as an exemplar. **Scientific Reports**, London, v. 9, p. 9883, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46330-5>.

FISCHER, J. E.; BACHMANN, L. M.; JAESCHKE, R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: Clinical example of sepsis. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 29, n. 7, p. 1043–1051, 2003.

GHANMI, S. *et al.* The periosteum-like effect of fresh human amniotic membrane on bone regeneration in a rabbit critical-sized defect model. **Bone**, New York, v. 110, p. 392-404, 2018.

GREAT BRITAIN. Home Office. **Annual statistics of scientific procedures on living animals, Great Britain 2018**. London: Home Office, 2019.

HAJIAN-TILAKI, K. O. *et al.* A comparison of parametric and nonparametric approaches to ROC analysis of quantitative diagnostic tests. **Medical Decision Making**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 94-102, 1997.

HAMPSHIRE, V.; ROBERTSON, S. Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring. **Lab Animal**, New York, v. 44, n. 7, p. 259-260, 2015.

HAWKINS, P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. **Laboratory Animals**, London, v. 36, n. 4, p. 378-395, 2002.

JENSEN, M. P. Questionnaire validation: a brief guide for readers of the research literature. **Clinical Journal of Pain**, Hagerstown, v. 19, n. 6, p. 345-352, 2003.

JIRKOF, P. *et al.* A safe bet? Inter-laboratory variability in behaviour-based severity assessment. **Laboratory Animals**, London, v. 54, n. 1, p. 73-82, 2019.

KAISER, H. F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, Colorado Springs, v. 23, p. 187-200, 1958.

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**, San Francisco v. 7, n. 9, p. 1-11, 2012.

KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: the arrive guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.

KIM, J. *et al.* Correlations between electrically quantified pain degree subjectively assessed visual analogue scale, and the mcgill pain questionnaire: a pilot study. **Annals of Rehabilitation Medicine**, Korea, v. 38, n. 5, p. 665-672, 2014.

KLINE, P. Psychometrics and psychology. **British Journal of Psychiatry**, London, v. 137, n. 2, p. 193, 1979.

KOHN, D. F. *et al.* Guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 46, n. 2, p. 97-108, 2007.

LALKHEN, A. G.; MCCLUSKEY, A. Clinical tests: sensitivity and specificity. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 221-223, 2008.

LANGENECKER, M. *et al.* Vergleichende untersuchung zur krankheitsverteilung bei kaninchen, meerschweinchen, ratten und frettchen. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere**, Stuttgart, v. 37, n. 5, p. 326-333, 2009.

LANGFORD, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 6, p. 447-449, 2010.

LEACH, M. C. *et al.* Behavioural effects of ovariectomy and oral

administration of meloxicam in laboratory housed rabbits. **Research in Veterinary Science**, London, v. 87, n. 2, p. 336-347, 2009.

MARTIN, P.; BATESON, P. Measuring behaviour: an introductory guide, second edition. *In*: MARTIN, P.; BATESON, P. **Measuring behaviour**: an introductory guide. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

MCDOWELL, I. The theoretical and technical foundations of health management. *In*: MCDOWELL, I. **Measuring health**: a guide to rating scales and questionnaires. Oxford: Oxford Scholarship, 2009. p. 10-46.

MEINTJES, R. A. An overview of the physiology of pain for the veterinarian. **Veterinary Journal**, London, v. 193, n. 2, p. 344-348, 2012.

MEROLA, I.; MILLS, D. S. Systematic review of the behavioural assessment of pain in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 18, n. 2, p. 60-76, 2016.

MILLMAN, S. T. Behavioral responses of cattle to pain and implications for diagnosis, management, and animal welfare. **Veterinary Clinics of North America**. Food Animal Practice, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 47-58, 2013.

PINHO, R. H. *et al.* Influence of the presence or absence of an observer on pain assessment in rabbits submitted to orthopaedic surgery. *In*: AVA AUTUMN MEETING, 2019, Ghent. **Proceedings** [...]. Ghent: AVA, 2019. p. 120.

QUARTERONE, C. *et al.* Ovariohysterectomy requires more post-operative analgesia than orchiectomy in dogs and cats. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 58, n. 11, p. 1191-1194, 2017.

RAY, P. *et al.* Statistical evaluation of a biomarker. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 112, n. 4, p. 1023-1040, 2010.

REID, J. *et al.* Development of the short-form Glasgow Composite Measure Pain Scale (CMPS-SF) and derivation of an analgesic intervention score. **Animal Welfare**, South Mimms, v. 16, p. 97-104, 2007.

REIJGWARDT, M. L. *et al.* The composition and initial evaluation of a grimace scale in ferrets after surgical implantation of a telemetry probe. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. e0187986, 2017.

RIALLAND, P. *et al.* Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: a prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. 1-10, 2012.

ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. **European Journal of Pain**, London, v. 7, n. 5, p. 397-406, 2003.

RSTUDIO TEAM. **RStudio team**: integrated development for R. Boston: RStudio, Inc., 2016.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SCHNELLBACHER, R. W. *et al.* Effects of intravenous administration of lidocaine and buprenorphine on gastrointestinal tract motility and signs of pain in New Zealand white rabbits after ovariohysterectomy. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 78, n. 12, p. 1359-1371, 2017.

SCHUSTER, C. A note on the interpretation of weighted kappa and its relations to other rater agreement statistics for metric scales. **Educational and Psychological Measurement**, Durham, v. 64, n. 2, p. 243-53, 2004.

SHEVTSOV, M. A. *et al.* Evaluation of the temporary effect of physical vapor deposition silver coating on resistance to infection in transdermal skin and bone integrated pylon with deep porosity. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 107, n. 1, p. 1-9, 2018.

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**, Thousand Oaks, v. 7, p. 55, 2011.

STREINER, D. L. Starting at the beginning: an introduction to coefficient alpha and internal consistency. **Journal of Personality Assessment**, Burbank, v. 80, n. 1, p. 99-103, 2003.

STREINER, D. L.; CAIRNEY, J. Operating characteristics curves. **Springer Series in Reliability Engineering**, Springer, v. 59, n. 2, p. 187-207, 2013.

STREINER, D. L.; NORMAN, G. R. Health measurement scales. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v. 48, n. 7, p. 1430, 2016.

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**, London, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2015.

TRINDADE, P. H. E. *et al.* Effect of work on body language of ranch horses in Brazil. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 1, p. e0228130, 2020.

TUYTTENS, F. A. M. *et al.* Opinion of applied ethologists on expectation bias, blinding observers and other debiasing techniques. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 181, p. 27-33, 2016.

UHLIG, C. *et al.* Anesthesia and monitoring in small laboratory mammals used in anesthesiology, respiratory and critical care research: a systematic

review on the current reporting in top-10 impact factor ranked journals. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. 1-22, 2015.

VAN LOON, J. P. A. M.; VAN DIERENDONCK, M. C. Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP): a scale-construction study. **Veterinary Journal**, London, v. 206, n. 3, p. 356-64, 2015.

WANG, X. *et al.* Biological and biomechanical evaluation of autologous tendon combined with ligament advanced reinforcement system artificial ligament in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. **Orthopaedic Surgery**, Richmond, v. 10, n. 2, p. 144-51, 2018.

WELLBEING, P. A. **PDSA animal wellbeing**. Bristol, UK: PDSA, 2019.

WENGER, S. Anesthesia and analgesia in rabbits and rodents. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, v. 21, n. 1, p. 7-16, 2012.

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**, Memphis, v. 58, n. 2, p. 2-7, 2019

APÊNDICES

Apêndice A - Etograma dos coelhos submetidos à cirurgia ortopédica (ORTO).

Comportamento	Descrição
<i>1. Atividade</i>	
Ativo	Se movimenta e/ ou se desloca
Inativo	Permanece imóvel
<i>2. Posicionamento na gaiola</i>	
Frente	Frente da gaiola
Fundo	Fundo da gaiola
Mudar de posição	Muda de lugar na gaiola: da frente para o fundo ou do fundo para a frente
<i>3. Postura</i>	
Típica	Fica com os membros pélvicos flexionados sob o quadril, membros torácicos sob o corpo; abdômen e tórax não apoiados no piso da gaiola
Sentado	Senta com membros torácicos estendidos verticalmente
Deitado	Deita com o abdômen e tórax em contato com o piso da gaiola e membros torácicos estendidos horizontalmente
Deitado de lado	Deita sob um dos lados do corpo, com membros torácicos estendidos horizontalmente; abdômen em contato com o piso
Quadrupedal	Fica em posição quadrupedal com os quatro membros estendidos verticalmente; abdômen distante do piso da gaiola
Bípede	Apoia sob os dois membros pélvicos; membros torácicos não tocam o piso
Mudar de postura	Alterna entre as diversas posturas
<i>4. Posicionamento das orelhas em relação ao corpo</i>	
Totalmente fletidas	Paralelas à coluna vertebral
Semifletidas	Semifletidas (posicionadas entre totalmente fletidas e eretas)
Eretas	Eretas, perpendiculares à coluna vertebral
Em tesoura	Cada uma das orelhas se direciona para posições distintas
<i>5. Abertura dos olhos</i>	

Abertos	Totalmente abertos
Semicerrados	Semicerrados
Fechados	Fechados
Não visíveis	Não foi possível visualizar os olhos
<i>6. Comportamentos típicos de coelhos</i>	
Saltar	Salta para se locomover com os dois membros pélvicos ao mesmo tempo
Saltar girando	Salta fazendo um giro de 180° ou 360° com os dois membros pélvicos ao mesmo tempo
Reagir	Movimenta a cabeça e/ou o corpo bruscamente em resposta a estímulo ambiental (ex. estímulo sonoro)
Chacoalhar corpo	Chacoalha o corpo todo
Chacoalhar a cabeça	Chacoalha apenas a cabeça
Cavar	Cava o piso
Explorar	Fareja o piso e/ou paredes e/ou grades da gaiola curiosamente
Roer	Rói o piso ou grade da gaiola
Pressionar membros	Pressiona membros torácicos contra o piso da gaiola, alternando entre os dois membros rapidamente
Alongar	Alonga o corpo
Coçar orelha	Coça as orelhas com os membros
Socar	Estende os membros torácicos horizontalmente, alternando rapidamente entre o direito e o esquerdo
<i>7. Interação com itens motivacionais</i>	
Interagir com a Pinha	Interage com a pinha (mastiga, rói, empurra com os membros torácicos)
Comer a cenoura	Come cenoura
<i>8. Comportamentos fisiológicos</i>	
Beber	Bebe água do bebedouro
Comer ração	Come ração no comedouro
Ingerir cecotrofos	Ingere cecotrofos da região anal
<i>9. Auto-limpeza: por lambedura; pode ter auxílio dos membros torácicos</i>	
Cabeça	Cabeça e orelhas
Corpo	Corpo, incluindo abdômen e membros (com exceção do membro afetado)
<i>10. Comportamentos relacionados à dor</i>	

Lamber área afetada	Lambe a região afetada
Apresentar espasmos	Apresenta espasmos na pele do dorso
Movimentar o corpo dorsalmente	Movimenta o corpo em direção dorsal rapidamente e sem razão aparente
Retrair	Retrai o corpo e fecha os olhos
Cambalear	Perde parcialmente o equilíbrio
Cair	Perde totalmente o equilíbrio; cai no piso
Tremer	Apresenta tremores observados em cabeça e orelhas
Suspender membro	Mantém o membro afetado suspenso
Apoiar e erguer	Ergue e volta a apoiar o membro afetado repetidamente
Tentar levantar	Tenta levantar, porém permanece em postura típica ou deitado
Contrair abdômen	Contrai a musculatura do abdômen

F: frequência; D: duração

Apêndice B - Mediana, mínimo e máximo da duração e frequência dos comportamentos dos coelhos antes (basal) e uma hora após a cirurgia (dor)

Comportamento	F/D	Observador	Basal	Dor
1.Período de atividade				
Ativo	D	Pr	280(0-300)*	0(0-300)
		Ab	300 (0-300)*	11(0-300)
Inativo	D	Pr	30(0-300)	300(0-300)*
		Ab	0(0-300)	289(0-300)*
2. Posição na gaiola				
Frente	D	Pr	204(0-300)*	0(0-300)
		Ab	161(0-300)	0(0-300)
Fundo	D	Pr	96(0-300)	300(0-300)*
		Ab	139(0-300)	300(0-300)
Mudar de posição	F	Pr	2(0-10)*	0(0-1)
		Ab	4(0-13)*	0(0-2)

3. Postura				
Típica	D	Pr	91 (0-300)	63 (0-300)
		Ab	142 (0-300)	117 (0-300)
Sentado	D	Pr	128 (0-300)	0(0-300)
		Ab	57 (0-300)	0(0-300)
Deitado	D	Pr	0(0-300)	0(0-300)*
		Ab	0(0-300)	0(0-300)
Deitado de lado	D	Pr	0(0-220)	0(0-0)
		Ab	0(0-0)	0(0-0)
Quadrupedal	D	Pr	0(0-98)*	0(0-4)
		Ab	0 (0-179)*	0(0-9)
Bípede	F	Pr	0(0-9)*	0(0-1)
		Ab	0(0-14)*	0(0-1)
	D	Pr	0(0-25)*	0(0-1)
		Ab	0(0-30)*	0(0-1)
Mudar de postura	F	Pr	2(0-19)*	0(0-3)
		Ab	4(0-28)*	0(0-3)
4. Orelhas				
Totalmente fletidas	D	Pr	0(0-281)	0(0-300)
		Ab	0 (0-243)	0(0-300)
Semi-fletidas	D	Pr	0(0-300)	45(0-300)*
		Ab	0(0-300)	125(0-300)*
Eretas	D	Pr	300(0-300)*	134 (0-300)
		Ab	300(0-300)*	83(0-300)
Em tesoura	D	Pr	0(0-300)	0(0-83)
		Ab	0(0-300)	0(0-99)
5. Olhos				
Abertos	D	Pr	293 (115-300)*	57(0-300)
		Ab	286 (0-300)*	10 (0-300)

Semi-cerrados	D	Pr	0(0-99)	94 (0-300)*	
		Ab	0 (0-55)	215 (0-300)*	
Fechados	D	Pr	0(0-0)	0(0-232)	
		Ab	0(0-0)	0(0-230)	
Não visíveis	D	Pr	3(0-138)	7(0-294)	
		Ab	14(0-300)	6(0-300)	
6. Comportamentos típicos					
Saltar	F	Pr	2(0-27)*	0(0-3)	
		Ab	4(0-20)*	0(0-4)	
Pular Girando	F	Pr	0(0-1)	0(0-0)	
		Ab	0(0-2)	0(0-1)	
Reagir	F	Pr	0(0-2)	0(0-1)	
		Ab	0(0-1)	0(0-1)	
Chacoalhar corpo	F	Pr	0(0-1)	0(0-1)	
		Ab	0(0-1)	0(0-1)	
Chacoalhar cabeça	F	Pr	0(0-6)*	0(0-0)	
		Ab	0(0-4)	0(0-6)	
Cavar	F	Pr	0(0-2)	0(0-0)	
		Ab	0(0-0)	0(0-0)	
	D	Pr	0(0-6)	0(0-0)	
		Ab	0(0-0)	0(0-0)	
Explorar	F	Pr	1(0-5)*	0(0-1)	
		Ab	3 (0-39)*	0(0-1)	
	D	Pr	3 (0-90)*	0(0-5)	
		Ab	40 (0-133)*	0 (0-19)	
	Roer	F	Pr	0(0-6)	0(0-0)
			Ab	0(0-12)*	0(0-0)
D		Pr	0(0-95)	0(0-0)	
		Ab	0(0-35)*	0(0-0)	
Pressionar membros	F	Pr	0(0-1)	0(0-1)	
		Ab	0(0-0)	0(0-3)	
Alongar	F	Pr	0(0-0)	0(0-0)	
		Ab	0(0-0)	0(0-0)	

Coçar orelha	F	Pr	0(0-2)	0(0-1)
		Ab	0(0-1)	0(0-1)
	D	Pr	0(0-9)	0(0-5)
		Ab	0(0-4)	0(0-4)
Socar	F	Pr	0(0-3)	0(0-5)
		Ab	0(0-8)	0(0-3)

7. Interação com itens motivacionais

Comer a cenoura	F	Pr	0(0-3)*	0(0-0)
		Ab	1(0-3)*	0(0-1)
	D	Pr	0(0-272)	0(0-0)
		Ab	21(0-247)	0(0-300)
Interagir com a Pinha	F	Pr	1(0-7)*	0(0-0)
		Ab	2(0-7)*	0(0-1)
	D	Pr	1(0-130)*	0(0-0)
		Ab	15(0-186)*	0(0-5)

8. Comportamentos fisiológicos

Beber	F	Pr	0(0-0)	0(0-0)
		Ab	0(0-1)	0(0-0)
	D	Pr	0(0-0)	0(0-0)
		Ab	0(0-133)	0(0-0)
Comer	F	Pr	0(0-2)	0(0-0)
		Ab	0(0-1)*	0(0-0)
	D	Pr	0(0-196)	0(0-0)
		Ab	0(0-300)	0(0-0)
Ingerir cecotrofos	F	Pr	0(0-5)	0(0-0)
		Ab	0(0-4)	0(0-0)
	D	Pr	0(0-193)	0(0-0)
		Ab	0(0-47)	0(0-0)

9. Auto-limpeza

Cabeça	F	Pr	0(0-6)	0(0-1)
		Ab	0(0-1)	0(0-3)
	D	Pr	0(0-30)	0(0-18)
		Ab	0(0-5)	0(0-38)
Corpo	F	Pr	0(0-10)*	0(0-3)
		Ab	1(0-9)*	0(0-6)

	D	Pr	0(0-163)*	0(0-22)
		Ab	1(0-209)*	0(0-226)
<i>10. Comportamentos relacionados à dor</i>				
Lamber área afetada	F	Pr	0(0-6)	0(0-10)
		Ab	0(0-3)	0(0-9)*
	D	Pr	0(0-83)	0(0-254)
		Ab	0(0-195)	0(0-300)
Apresentar espasmos	F	Pr	0(0-2)	0(0-3)
		Ab	0(0-0)	0(0-3)
Movimentar o corpo dorsalmente	F	Pr	0(0-1)	0(0-2)
		Ab	0(0-0)	0(0-4)*
Retrair	F	Pr	0(0-2)	1(0-3)*
		Ab	0(0-1)	1(0-4)*
Cambalear	F	Pr	0(0-0)	0(0-12)
		Ab	0(0-0)	0(0-5)
Cair	F	Pr	0(0-0)	0(0-0)
		Ab	0(0-2)	0(0-0)
Tremar	F	Pr	0(0-1)	0(0-2)*
		Ab	0(0-0)	0(0-2)*
	D	Pr	0(0-38)	0(0-300)*
		Ab	0(0-0)	0(0-300)*
Suspender membro	F	Pr	0(0-0)	0(0-5)*
		Ab	0(0-0)	0(0-5)*
	D	Pr	0(0-0)	0(0-270)*
		Ab	0(0-0)	0(0-290)*
Apoiar e erguer o membro	F	Pr	0(0-3)	0(0-17)
		Ab	0(0-1)	0(0-28)
Tentar levantar	F	Pr	0(0-0)	0(0-2)*
		Ab	0(0-0)	0(0-2)*
Contrair abdômen	F	Pr	0(0-0)	0(0-0)
		Ab	0(0-1)	0(0-1)

D: duração em segundos; F: frequência em número de ocorrências; Pr: Presença do observador; Ab: Ausência do observador; * indica diferença significante maior

pelo teste de Wilcoxon, com $p < 0,05$

Apêndice C – Escala comportamental para avaliar a dor aguda em coelhos (RPBS) antes do refinamento baseada na ocorrência dos comportamentos após cirurgia ortopédica ou de tecidos moles, que foi avaliada pelos observadores após assistirem os vídeos.

Comportamentos	ORTO	OSH	Item da escala
Postura			
Movimentar-se, saltar, mudar de posição	X	X	A) se desloca normalmente e/ou salta
Postura quadrupedal, postura bipedal	X	X	B) apresenta posição bipedal ou quadrupedal
Anda em ritmo muito lento		X	C) se desloca lentamente
Deitado	X	X	D) fica deitado com abdômen em contato com o piso na maior parte do tempo
Movimentar-se, mudar de posição	X	X	E) não se desloca durante a maior parte do tempo
Atividade			
Ativo	X	X	A)se movimenta normalmente e/ou quando parado exerce atividade normal*
Muda de postura			B)pouco se movimenta** e não exerce atividade normal
Inativo			C)está imóvel e não exerce atividade normal
Interação e apetite			
Interagir com objetos da gaiola	X	X	A) interage com objetos de enriquecimento ambiental
Come ração ou vegetais	X	X	B) come
Explorar	X	X	C) fareja o ambiente e está curioso

Auto-limpeza	X	X	D) apresenta comportamento de auto-limpeza (grooming), exceto o local da cirurgia
Expressão facial			
Olhos abertos; orelhas eretas	X		A) mantém olhos bem abertos e as orelhas eretas durante todo o tempo
Olhos semicerrados	X		B) apresenta olhos semicerrados ou fechados
Orelhas fletidas	X	X	C) apresenta orelhas fletidas
Atenção à área afetada			
Lamber região da cirurgia	X	X	A) lambe a área afetada
Pressionar o abdomen contra o chão		X	B) pressiona o abdomen contra o chão
Suspender membro	X		C) mantém um membro suspenso
Miscelânea de comportamentos			
Tentar Levantar	X		A) faz menção de se levantar, porém permanece deitado
Espasmos		X	B) apresenta espasmos da pele do dorso
Movimento dorsal sem razão aparente	X	X	C) apresenta movimento rápido dorsal do corpo
Encolher; retrain	X	X	D) se retrai e fecha os olhos
Tremor	X		E) apresenta tremores

ORTO: comportamentos identificados no etograma dos animais submetidos à cirurgia ortopédica; OSH: comportamentos identificados no etograma de animais submetidos à OSH (Leach et al. 2009). A coluna da direita (itens da escala) representa a versão da escala anterior ao refinamento.

Apêndice D - Validação de conteúdo. Cada item da escala foi avaliado pelo comitê de especialistas quanto a sua relevância: item irrelevante (-1); não sabe responder (0); relevante (1).

ITEM DA ESCALA	Especialista em dor	Anestesiologista Experiente	Veterinário Bioterista	Escore do item
1. POSTURA E LOCALIZAÇÃO				
se desloca normalmente e/ou salta	1	1	1	1
está em posição bipedal ou quadrupedal	1	1	1	1
se desloca lentamente	1	1	0	0,7
está deitado com abdômen em contato com o piso	1	1	1	1
está no fundo da gaiola na maior parte do tempo	1	1	1	1
2. ATIVIDADE				
se movimenta normalmente e/ou quando parado exerce atividade normal	1	1	1	1
pouco se movimenta e não exerce atividade normal	1	1	1	1
está imóvel e não exerce atividade normal	1	1	1	1

3. INTERAÇÃO E APETITE				
interage com objetos de enriquecimento ambiental	1	1	0	0,7
Come	1	1	1	1
fareja o ambiente e está curioso	1	1	1	1
apresenta comportamento de auto-limpeza, exceto a área afetada	1	1	1	1
4. EXPRESSÃO FACIAL				
mantém olhos bem abertos e as orelhas eretas durante todo o tempo	1	1	1	1
apresenta olhos semicerrados	1	1	1	1
apresenta orelhas fletidas	1	1	1	1
5. ATENÇÃO A ÁREA AFETADA				
lambe a área afetada	1	1	1	1
pressiona o abdômen contra o chão	1	1	1	1
mantém um membro suspenso	1	1	1	1
6. MISCELÂNEA DE COMPORTAMENTOS				
faz menção de se levantar, porém permanece deitado	1	1	0	0,7
apresenta espasmos da pele do dorso	1	1	1	1
apresenta movimento rápido dorsal do corpo	1	1	1	1
se retrai e fecha os olhos	1	1	1	1
apresenta tremores	1	1	1	1

Apêndice E – Critérios de refinamento para os itens da escala segundo as análises descritas na Tabela 3.

Itens/Teste	F	Intra	Inter	Resp	ACP	CIT	CI	Esp	Sen	POD	TOTAL
Postura	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9
Atividade	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
Interação e apetite	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9
Expressão facial	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9
Atenção à área afetada	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	6
Miscelânea de comportamentos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10

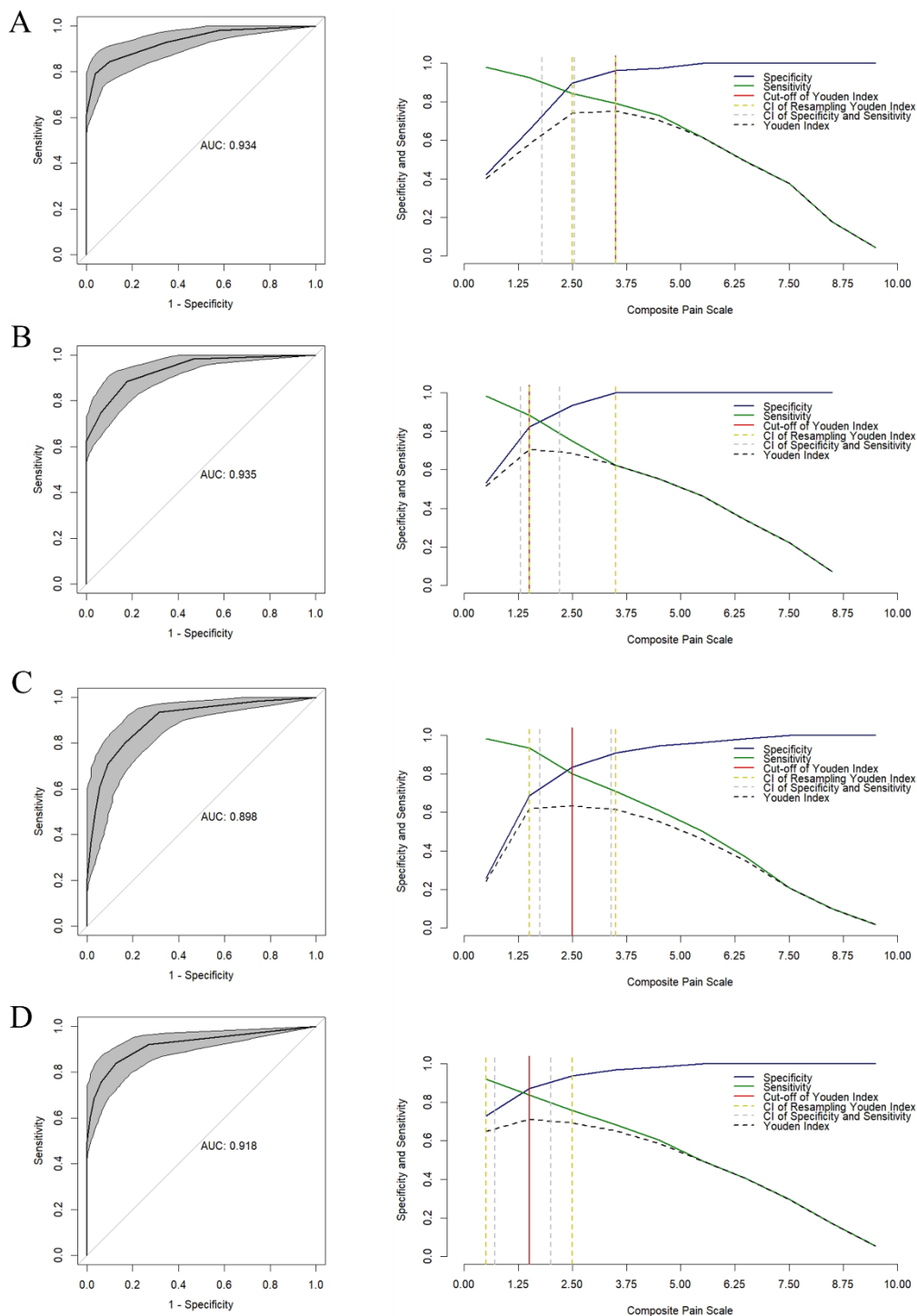
F: frequência de ocorrência do item - aceitaram-se os itens presentes com frequência > 30% das avaliações dos 4 avaliadores agrupados em MA; Intra: confiabilidade intraobservador; Inter: confiabilidade interobservador - aceitaram-se os itens com confiabilidade intra e interobservador > 60% para ao menos dois avaliadores; Resp: responsividade; aceitaram-se os itens em que houve aumento do escore no momento dor em relação ao basal; ACP: Análise de componentes principais - aceitaram-se os itens com auto valor $\geq 0,5$ ou $\leq 0,5$; CIT: correlação item-total - aceitaram-se os itens com correlação $> 0,3$; CI: consistência interna - aceitaram-se os itens com $CI > 0,7$ em MA; Esp: especificidade - aceitaram-se os itens com $Esp > 70\%$; Sen: sensibilidade - aceitaram-se os itens com $Sen > 70\%$; POD: padrão de ocorrência ao longo do dia - aceitaram-se os itens cuja ocorrência não foi diferente entre manhã, tarde e noite. Os itens que obtiveram ao menos 7/10 critérios listados foram aceitos na escala (em negrito).

Apêndice F – Critérios para o refinamento dos subitens da escala.

Subitens/Teste	F	Intra	Inter	ACP	POD	TOTAL
se desloca normalmente e/ou salta	1	1	1	1	1	5
está em posição bipedal ou quadrupedal	1	1	1	1	1	5
se desloca lentamente	0	1	1	0	1	3
está deitado com abdômen em contato com o piso	1	1	1	1	1	5
está no fundo da gaiola na maior parte do tempo	1	1	1	1	1	5
interage com objetos de enriquecimento ambiental	1	1	1	1	1	5
Come	1	1	1	0	1	4
fareja o ambiente e está curioso	1	1	1	1	1	5
apresenta comportamento de auto-limpeza, exceto a área afetada	1	1	1	0	1	4
mantém olhos bem abertos e as orelhas eretas durante todo o tempo	1	1	0	1	1	4
apresenta olhos semicerrados	1	1	1	1	1	5
apresenta orelhas fletidas	1	0	0	1	1	3
lambe a área afetada	1	1	1	0	1	4
pressiona o abdomen contra o chão	0	1	1	0	1	3
mantém um membro suspenso	1	1	1	0	1	3
faz menção de se levantar, porém permanece deitado	1	1	1	0	1	3
apresenta espasmos da pele do dorso	0	0	0	0	1	1
apresenta movimento rápido dorsal do corpo	0	1	0	0	1	2
se retrai e fecha os olhos	1	0	0	0	1	2
apresenta tremores	1	1	1	1	1	4

F: frequência de ocorrência do subitem - aceitaram-se os itens com frequência de observação >50 em MA; Intra: confiabilidade intraobservador e inter confiabilidade interobservador - aceitaram-se os subitens com confiabilidade intra e interobservador >60% para ao menos dois avaliadores; ACP: análise de componentes principais - aceitaram-se os subitens com auto valor $\geq 0,5$ ou $\leq -0,5$; POD: padrão de ocorrência ao longo do dia - aceitaram-se os subitens cuja ocorrência não foi diferente entre manhã, tarde e noite. Mantiveram-se os subitens com ao menos 2/5 dos critérios (em negrito).

Apêndice G - Curva ROC e área sob a curva e zona de incerteza diagnóstica.



À esquerda: curva de característica da operação do receptor (ROC) com intervalo de confiança (IC) de 95% calculada a partir de 1.001 reamostragens. À direita: dois gráficos da curva ROC representando a especificidade, a sensibilidade, o índice de Youden, o

ponto de corte, o intervalo de confiança (IC) de 1.001 reamostragens e os pontos com sensibilidade e especificidade $>0,90$. O valor mais baixo e mais alto do IC e do intervalo entre a especificidade e sensibilidade $>0,90$, levando em conta todos os avaliadores, foi usado para considerar a zona de incerteza diagnóstica. A)avaliador 1 e padrão-ouro; B) avaliador 2; C) avaliador 3; D)avaliador 4.