

FERRAMENTAS TECNOLÓGICAS PARA O REFINAMENTO EXPERIMENTAL

Data de aceite: 03/07/2023

Klena Sarges Marruaz da Silva

Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-5996-490X

1 | INTRODUÇÃO

A realização de pesquisas biomédicas e testes para assegurar o uso de produtos médicos humanos e veterinários ainda são inevitáveis na atualidade, devido à falta de métodos alternativos validados em número suficiente para substituir completamente a utilização de animais não humanos em pesquisas. Portanto, apesar de não tão debatido pela sociedade quanto à substituição e redução do uso de animais para esses fins (**R***Replacement* – **R***Reduction*), o refinamento é um **R** que merece melhor atenção para aplicação do Princípio dos 3Rs preconizado por Russel e Burch (1959) e da Cultura do Cuidado (HAWKINS; BERTELSEN, 2019).

Para que os animais possam experimentar menor sofrimento e melhorar

o seu bem-estar durante as práticas biomédicas, é necessário um olhar apurado e cauteloso dos técnicos, médicos veterinários e pesquisadores envolvidos no manejo desses animais, e, para tal, o uso de ferramentas tecnológicas apoiando a prática dos 3Rs e auxiliando uma avaliação mais sensível do grau de exposição dos animais a procedimentos invasivos é e será essencial neste século.

A tecnologia da informação é aliada da transformação social e da passagem para uma sociedade 5.0, que não deve ser somente automatizada, conectada e auxiliada pelo aprendizado das máquinas para resolução e predição de problemas futuros (SILVA *et al.*, 2021), mas sobretudo concatenada com a resolução de desafios atuais lançados pela sociedade civil, como o respeito aos animais e práticas que comprovem nossa consciência da senciência animal.

Desta forma, neste capítulo abordaremos métodos inovadores para aplicação do refinamento na anamnese clínica e comportamental de animais

submetidos a procedimentos, os quais devem ser adotados na experimentação animal para apoiar uma boa avaliação do Ponto Final Humanitário.

2 | EXAMES POR IMAGEM E WEARABLES NA ANAMNESE DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Diferentes intervenções experimentais em animais de laboratório, como cirurgias, inoculações ou mesmo procedimentos de manejo, podem provocar respostas de estresse de curta duração ou mesmo distresse. Os sinais de angústia e dor que os animais manifestam durante esses procedimentos são avaliados por indicadores do estado físico, bioquímico e psicológico dos animais, tais como mudanças no peso corporal e sistemas de pontuação clínica, como já descritos nos capítulos anteriores.

Várias são as tecnologias já disponíveis para avaliar esses indicadores, tais como exames por imagem que permitem maior acurácia, como a ultrassonografia em 3D, a tomografia e a ressonância magnética, os quais permitem avaliar o interior dos organismos dos animais e analisar, por exemplo, o crescimento de tumores ou o alastramento de infecções virais e bacterianas, sem a necessidade de cirurgias exploratórias ou coletas de sangue contínuas.

O uso da telemetria não invasiva no monitoramento de parâmetros fisiológicos de animais submetidos a pesquisas já é uma realidade desde a década de 1990 (O'NEILL *et al.*, 1990) e consiste no uso de sensores posicionados nos animais, sem a necessidade de implantação cirúrgica, para avaliação dos parâmetros fisiológicos. Ao se utilizar a transmissão de dados via *wireless* (por isso considerado um *Wearable* - um produto tecnológico utilizado acoplado ao corpo), permite-se a avaliação de animais, conscientes e com suas atividades no alojamento normalmente mantidas, em tempos curtos ou prolongados, pois se utiliza de sensores/transdutores que são adaptados a uma jaqueta que deve ser vestida no animal a ser estudado (SILVA *et al.*, 2021) (Figura 1). A telemetria não invasiva não só permite a correlação entre os sinais de dor e os parâmetros de atividade, pressão arterial e eletrocardiograma, como fornece dados considerados mais preditivos, uma vez que já é conhecida a interferência da contenção em animais de laboratório nos parâmetros avaliados em um experimento, incluindo aumentos na temperatura corporal, frequência cardíaca e pressão arterial, níveis plasmáticos de epinefrina e norepinefrina, mudanças nas respostas a medicamentos e diminuição da ingestão de alimentos e peso corporal (KRAMER, 2000; KRAMER *et al.*, 2001).

Embora haja uma necessidade de adaptação dos animais às jaquetas e transdutores, a telemetria não invasiva vem sendo cada vez mais utilizada, inclusive para animais de médio porte, como cães e primatas não humanos, facilitando, principalmente, o acompanhamento de estudos toxicológicos (CHUI *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2010), pois estudo retrospectivo demonstrou que o uso da telemetria invasiva (que utiliza o

implante cirúrgico dos sensores) ainda apresenta vieses e uma qualidade de baixa a média na reprodutibilidade dos experimentos (GKROUZODI; TSINGOTJIDOUA; JIRKOF, 2022).

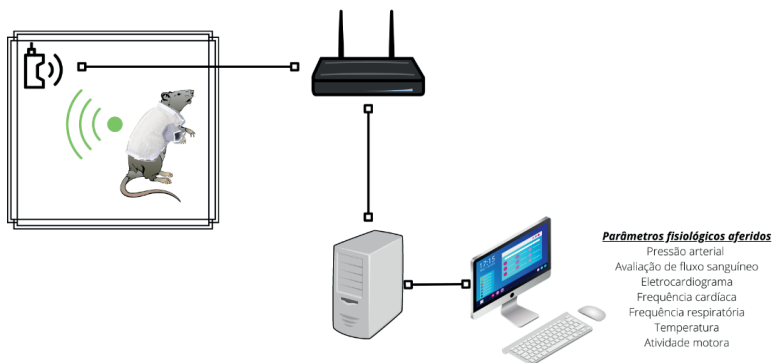


Figura 1. Transmissão de dados de parâmetros fisiológicos a partir de *wearables* para animais experimentais – Telemetria não invasiva

Fonte: Klena S. M. Silva, 2023.

3 | A INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA DOR E BEM-ESTAR DE ANIMAIS UTILIZADOS EM PESQUISAS

Mudanças comportamentais, como manutenção de atividades cotidianas de roedores utilizados em pesquisas, como a escavação e a nidificação, refletem o estado psicológico dos animais. Sua permanência durante o período em que são observados na experimentação indicam bem-estar, e a deterioração da atividade dessas atividades em camundongos e ratos pode indicar distúrbio neurológico, dor e estresse (JIRKOF, 2014).

Um dos tópicos importantes para aplicação correta do ponto final humanitário é a exclusão de procedimentos que causem dor injustificável aos animais. Nesse sentido, algumas soluções tecnológicas estão disponíveis para avaliação de parâmetros fisiológicos e comportamentos manifestados que são associados à expressão de dor.

A mensuração da sensação de dor é especialmente difícil em roedores porque eles não são verbais. Escalas criadas a partir da observação da forma como algumas regiões do corpo se apresentam, em especial da face, como as *Grimace Scale* (LANGFORD *et al.*, 2010; LEACH *et al.*, 2012; SOTOCINAL *et al.*, 2011), indicam-nos comportamentos que podem auxiliar na inferência do estágio de dor, porém ainda não são precisas para guiar um ponto final humanitário seguro. As *Grimace Scale*, particularmente, não funcionam bem com experimentos que envolvem modelos de dor neuropática, com exceção do modelo de

lesão por constrição crônica na área do trigêmeo (AKINTOLA *et al.*, 2017). Assim, algumas ferramentas tecnológicas estão sendo elaboradas a partir de estímulos nociceptivos mecânicos ou térmicos que permitem observar os comportamentos dos camundongos e categorizá-los em reações associadas a dor e desconforto ou ausência destes (VIDAL *et al.*, 2022).

Abdus-Saboor *et al.* (2019), ao perceberem que seria necessário avançar em ferramentas que pudessem auxiliar em uma aferição de grau de dor mais acurada, desenvolveram um método objetivo para avaliar a sensação de dor em camundongos a partir da videografia de alta velocidade para capturar características comportamentais, em menos de um segundo, após a estimulação da pata traseira com estímulos nocivos e inócuos, identificando vários parâmetros de diferenciação que indicam os aspectos afetivos e reflexivos da nocicepção, a partir do reflexo de retirada da pata traseira. O método utilizado pelos pesquisadores utilizou modelagem estatística e aprendizado de máquina (inteligência artificial) para criar uma outra escala de dor de camundongos que permite avaliar a sensação de dor de maneira graduada para cada retirada de estímulo invasivo. De modo interessante, o experimento demonstrou que camundongos de linhagens e sexos diferentes parecem apresentar limiares diferentes de dor frente aos mesmos estímulos, demonstrando que o uso da inteligência artificial pode nos ajudar a compreender de maneira mais assertiva o limite para manutenção de animais em experimentos que requeiram alto grau de invasividade ou repetições de inoculações ou administrações parenterais, incluindo o conhecimento sobre aquelas linhagens e sexo que devam ser excluídos em função da sensibilidade maior a procedimentos desse tipo.

O desenvolvimento de ferramentas que utilizam inteligência artificial para esse fim continua avançando e utilizando técnicas mais evoluídas como *deep learning*, que utiliza redes neurais profundas, encontradas nas plataformas DeepLabCut, LEAP, SLEAP, aplicadas para avaliar os padrões comportamentais de vários animais ao mesmo tempo (FRIED *et al.*, 2020).

Fazemos aqui um “breve aparte” no texto para melhor compreensão dos colegas sobre o emprego dessas tecnologias.

Fundamentalmente, inteligência artificial por aprendizado de máquina ou *machine learning* é a utilização de algoritmos para extrair informações de dados brutos e representá-los através de algum tipo de modelo matemático. Esse modelo é, então, utilizado para fazer inferências a partir de outros conjuntos de dados. Já *deep learning* ou redes neurais artificiais de Aprendizado Profundo é uma das áreas da inteligência artificial que emprega algoritmos para processar dados e imitar o processamento feito pelo cérebro humano, aumentando a capacidade da máquina de registrar padrões que, muitas vezes, não são óbvios para o próprio cérebro humano; assim, utilizam camadas e camadas a mais de informações para estabelecer padrões para categorizações. Graças ao uso de *deep learning*, é possível elaborar soluções tecnológicas com visão computacional, reconhecimento de

fala, processamento de linguagem natural e reconhecimento de áudio (DATA SCIENCE ACADEMY, 2022).

Muito se ouve também sobre o emprego de redes neurais convolucionais profundas (CNN), que é também um algoritmo de Aprendizado Profundo, mas que pode captar uma imagem de entrada, atribuir importância (pesos e vieses que podem ser aprendidos) a vários aspectos/objetos da imagem e ser capaz de diferenciar um do outro. O pré-processamento exigido em uma CNN é muito menor em comparação com outros algoritmos de classificação. Enquanto nos métodos primitivos os filtros são feitos à mão, com treinamento suficiente, as CNN têm a capacidade de aprender esses filtros/características, pois sua arquitetura é análoga ao padrão de conectividade de neurônios no cérebro humano e foi inspirada na organização do córtex visual, por isso é particularmente bem adaptada para classificar imagens (DATA SCIENCE ACADEMY, 2022).

A plataforma chamada DeepLabCut, já amplamente adotada em toda a comunidade de neurociência comportamental, usa redes neurais profundas para realizar a estimativa de posturas sem a necessidade de colocar marcadores refletivos nos animais. A plataforma foi construída a partir de um algoritmo de estimativa de posturas anterior chamado DeeperCut, que usava milhares de conjuntos de dados rotulados para rastrear com precisão partes do corpo de humanos envolvidos em diversas tarefas, desde remar até arremessar uma bola de beisebol, demonstrando que a translação pode ser inversa ao adaptarmos ferramentas tecnológicas já existentes para uso em humanos aos animais experimentais (FRIED *et al.*, 2020).

Na atualidade, já foram desenvolvidos ou estão em desenvolvimento alguns aplicativos (tanto em versões para uso em web ou versão para uso em celulares) para reconhecimento de dor e bem-estar em animais de laboratório, que utilizam o reconhecimento facial e empregam inteligência artificial (*deep learning*).

O Rodent Face Finder® (TUTTLE *et al.*, 2018) identifica e extrai quadros de vídeo quando camundongos ou ratos estão de frente para a câmera. No entanto, esse software não elimina dois dos aspectos mais demorados e subjetivos do uso de escalas de careta: treinar pessoal de laboratório para pontuar imagens e pontuar o grande número de imagens que são geradas como parte de cada experimento. A adoção generalizada de escalas de caretas tem sido limitada como resultado, apesar de essas escalas serem reproduzíveis entre laboratórios e preverem com precisão a eficácia analgésica.

Vidal e colaboradores das universidades do Texas e de Houston (EUA) (2022) desenvolveram um software que pode detectar automaticamente o nível de dor nos ratos a partir do aprendizado de máquina e visão computacional baseados em *deep learning*, capaz de detectar faces frontais de camundongos albinos e estimar o nível de dor usando pistas oculares. O software prevê o nível de aspecto facial da dor em níveis de 0 (não dor) a 2 (dor moderada) com base no aperto orbital espontâneo dos animais, apresentando média de 97.2% de acurácia.

Na Alemanha, a união de cientistas de dados do Departamento de Visão Computacional e sensoriamento remoto da Technische Universität Berlin e profissionais especialistas em Ciência em Animais de Laboratório da Freie Universität Berlin proporcionou a elaboração de um software totalmente automatizado para a vigilância dos efeitos pós-cirúrgicos e pós-anestésicos em camundongos, que utiliza duas arquiteturas de rede neural convolucional profunda (CNN) de última geração pré-treinadas (ResNet50 e InceptionV3) e a compararam com uma terceira arquitetura CNN sem pré-treinamento. Os resultados iniciais da aplicação da ferramenta em camundongos C57/BL6 alcançou uma precisão de até 99% para o reconhecimento da ausência ou presença de efeitos pós-cirúrgicos e/ou pós-anestésicos a partir da análise da expressão facial (reconhecimento facial) (Figura 2). O objetivo final do software é a disponibilização futura de um “mini-isolador inteligente”, com monitoramento 24 horas por vídeo de expressões faciais, bem como outros parâmetros comportamentais e uma função de alerta indicando que o bem-estar de um animal está prejudicado. Está ainda nos planos da equipe o uso do software em versão app (aplicativo) que apoie o médico veterinário e membros da equipe de pesquisa na avaliação do ponto final humanitário a partir da *Grimace Scale* (ANDRESEN *et al.*, 2020).

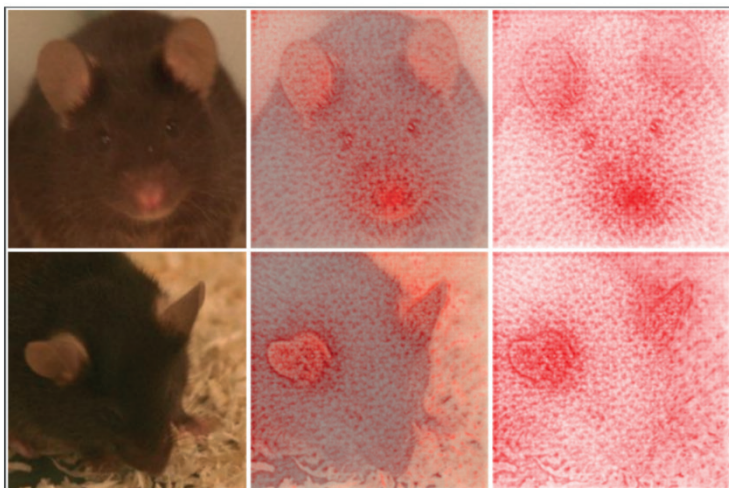


Figura 2. Visualização do processo de tomada de decisão pelos algoritmos treinados por Andresen e colaboradores (2020) com imagens geradas a partir de orelhas, focinho e vibrissas e imagem original combinada com mapa de calor utilizada

Fonte: Andresen *et al.*, 2020.

Na China, o DeepMGS também utiliza CNN a partir da classificação da *Grimace Scale* para camundongos, corta automaticamente as imagens do rosto do animal, mapeia as áreas por calor, prevê pontuações de unidades de ação e pontuações totais na *Grimace*

Scale e, por fim, infere se existe dor com uma precisão de 70–90% (CHIANG *et al.*, 2022).

Embora os softwares que utilizam o reconhecimento facial a partir da *Grimace Scale* ainda apresentem uma classificação binária simples nas categorias “sem dor” e “com efeito dor”, a intenção é o refinamento contínuo dos softwares para uma classificação mais complexa, envolvendo as inúmeras variáveis correlacionadas ao protocolo de pesquisa adotado, que podem influenciar na manifestação de dor e angústia em animais de laboratório, e outros repertórios comportamentais que não somente a observação da expressão facial.

Em geral, procedimentos cirúrgicos que incluem anestesia inalatória e tratamento analgésico, dependendo do manejo da analgesia, causam maior comprometimento do bem-estar do que apenas a anestesia inalatória, o que pode ser avaliado por parâmetros comportamentais, como construção de ninhos (JIRKOF *et al.*, 2013 *apud* ANDRESEN *et al.*, 2020). No entanto, quando assumimos que há dor pós-cirúrgica após a castração e que é improvável que a anestesia realizada induza à dor, eliminamos do *checklist* de avaliação de um bom protocolo e, portanto, da avaliação de ponto final humanitário, que a anestesia dissociativa cetamina e xilazina, por exemplo, pode danificar o tecido no local da injeção, o que pode ser associado a uma sensação dolorosa (WELLINGTON; MIKAELIAN; SINGER, 2013). A anestesia pode, ainda, induzir angústia pós-anestésica por diversas causas. O isoflurano pode produzir efeitos irritantes nas vias aéreas dos animais ao ativar os canais iônicos nociceptivos (MATTA *et al.*, 2008). Assim, as técnicas de aprendizado de máquina que serão aplicadas futuramente tendem a melhorar a caracterização de comportamento de dor a partir da análise de outras tantas variáveis.

Não somente a *Grimace Scale* pode ser utilizada para avaliação de dor e distresse por meio desses softwares com desenvolvimento apoiado em *deep learning*. O DeepSqueak utiliza técnica de CNN (Faster-RCNN) e foi projetado para permitir a detecção e análise de vocalizações ultrassônicas de camundongos e ratos (aquelas que estão >20 kHz). Comparado com outros softwares modernos e análise manual, o DeepSqueak foi capaz de reduzir falsos positivos, aumentar a recuperação de detecção, reduzir o tempo de análise, otimizar a classificação automática de sílabas das vocalizações e executar a análise de sintaxe automática em números arbitrariamente grandes de sílabas, mantendo a revisão de seleção manual e classificação supervisionada. O software permite a gravação das vocalizações dos animais e análise de outros comportamentos que não somente a expressão de dor, fornecendo uma outra dimensão de *insights* sobre o comportamento quando combinados com medidas convencionais de resultados ou mesmo a avaliação a partir da *Grimace Scale* (COFFEY; MARX; NEUMAIER, 2019).

A aplicação de CNN também já está disponível para avaliação de dor em outras espécies animais utilizadas em pesquisas biomédicas, como o cavalo (ASK *et al.*, 2020; LECIONE *et al.*, 2021), também baseada na *Grimace Scale* da espécie, e para ovelhas, utilizando a técnica *Support Vector Machine* (SVM) (LU; MAHMOUD; ROBINSON, 2017),

que vem a ser um modelo de aprendizado supervisionado com algoritmos de aprendizado associados que analisam dados para classificação e análise de regressão (CORTES; VAPNIK, 1995).

Todos esses softwares e outros que estão em desenvolvimento, em breve, estarão disponíveis para utilização rotineira por profissionais que atuam na experimentação animal. Embora nenhum deles tenha manifestado ainda a intenção de serem disponibilizados ao mercado consumidor, essa expectativa é inevitável, uma vez que o desenvolvimento de soluções inovadoras mantém a premissa da inovação aberta, permitindo que a sociedade possa se beneficiar daquilo que é produzido na Academia.

4 | CENÁRIOS POSSÍVEIS PARA UM FUTURO COM USO MÍNIMO DE ANIMAIS EM PESQUISAS E FOCADO NO BEM-ESTAR ANIMAL

Dados sobre, por exemplo, quais os critérios e como um ponto final humanitário foi implementado durante um experimento, quais as práticas adotadas para avaliação do bem-estar de animais durante o experimento, quais são as tendências na gravidade real nos projetos e como são estes explicados, conforme indicam Hawkins e Bertelsen (2019) em sua visão sobre o papel do Refinamento na Cultura do Cuidado, poderão subsidiar plataformas com aplicação de inteligência artificial que realizem predições.

A transparência e a melhoria do bem-estar de animais utilizados em pesquisas, que antes eram um anseio somente da sociedade civil, vêm se tornando um objetivo para cientistas no mundo todo. Em 2018, após anos de reservas e omissão de informações acerca das condições de animais utilizados em pesquisas, 592 cientistas (incluindo 4 premiados com o Nobel), estudantes e trabalhadores de biotérios dos Estados Unidos publicaram uma carta no jornal *USA Today* que conclama as instituições de pesquisa americanas a realizarem a abertura de informações sobre suas pesquisas com animais (USA TODAY, 2022), demonstrando que o acesso e compartilhamento de dados sobre práticas de manejo durante a experimentação serão fundamentais para uma aplicação cada vez mais coerente do que chamamos de ponto final humanitário.

A Ciência Aberta pode ajudar a aumentar a transparência de muitas partes do processo de pesquisa, em especial o manejo com os animais, e sua implementação deve, portanto, ser considerada pelos pesquisadores da experimentação animal como uma oportunidade valiosa que pode contribuir para a adesão ao Princípio dos 3R e prática aprimorada do ponto final humanitário (NAWROTH; TOBIAS, 2022).

É fundamental o desenvolvimento de sistemas integrados e abertos baseados em computação em nuvem e de ponta, aplicativos e serviços. Embora a pesquisa tenha sido feita sobre precisão na agricultura, ainda há muito trabalho a ser feito na integração da rede de sensores especializada em sistemas com os atuais serviços e infraestrutura em nuvem, e abrindo os dados e sistemas para compartilhamento, programabilidade e

inovação adicional.

A melhoria dos *wearables* focada na minimização de vieses por estresse adaptativo de uso de jaquetas por animais e o desenvolvimento de IoTs (Internet das coisas - dispositivos dotados de tecnologia embarcada, sensores e conexão com a rede que são capazes de reunir e de transmitir dados) (CONNER, 2010) também são uma perspectiva presumível em um cenário de pleno desenvolvimento tecnológico pós-implantação da rede de internet 5G nos países aliados, à espera de uma próxima geração que trará como premissa obrigatória a manutenção do bem-estar animal em todas os domínios de relação entre animais humanos e animais não humanos.

REFERÊNCIAS

- ABDUS-SABOOR, I.; FRIED, N. T.; LAY, M.; BURDGE, J.; SWANSON, K.; FISCHER, R.; JONES, J.; DONG, P.; CAI, W.; GUO, X.; TAO, Y. X.; BETHEA, J.; MA, M.; DONG, X.; DING, L.; LUO, W. Development of a Mouse Pain Scale Using Sub-second Behavioral Mapping and Statistical Modeling. **Cell Reports**, v. 28, n. 6, p. 1623-1634.e4, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.017>.
- AKINTOLA, T.; RAVER, C.; STUDLACK, P.; UDDIN, O.; MASRI, R.; KELLER, A. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. **Neurobiol Pain**, v. 2, p. 13-17, 2017.
- ANDRESEN, N.; WÖLLHAF, M.; HOHLBAUM, K.; LEWEJOHANN, L.; HELLWICH, O.; THÖNE-REINEKE, C.; BELIK, V. Towards a fully automated surveillance of well-being status in laboratory mice using deep learning: Starting with facial expression analysis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, e0228059, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228059>.
- ASK, K.; RHODIN, M.; TAMMINEN, LM.; ELIN HERNLUND, E.; ANDERSEN, P. H. Identification of body behaviors and facial expressions associated with induced orthopedic pain in four equine pain scales. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2155, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10112155>.
- CHIANG, C.-Y.; CHEN, Y.-P.; TZENG, H.-R.; CHANG, M.-H.; CHIOU, L.-C.; PEI, Y.-C. Deep Learning-Based Grimace Scoring Is Comparable to Human Scoring in a Mouse Migraine Model. **J. Pers. Med.** v. 12, p. 851, 2022. <https://doi.org/10.3390/jpm12060851>.
- CHUI, R. W.; FOSDICK, A.; CONNER, R.; JIANG, J.; BRUENNER, B. A.; VARGAS, H. M. Assessment of two external telemetry systems (PhysioJacket and JET) in beagle dogs with telemetry implants. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 60, n. 1, p. 58–68, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.04.196>.
- COFFEY, K. R.; MARX, R. G.; NEUMAIER, J. F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacol**, v. 44, p. 859–868, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>.
- CONNER, M. Sensors empower the “Internet of Things”. **EDN**, v.10, p. 32-38, 2010.
- CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine Learning**, v. 20, n. 3, p. 273–297, 1995. doi:10.1007/BF00994018.

DATA SCIENCE ACADEMY. **Deep Learning Book**. Disponível em: <https://www.deeplearningbook.com.br/> doi: 10.3389/fvets.2022.810989

FRIED, N. T.; CHAMESSIAN, A.; ZYLKA, M. J.; ABDUS-SABOOR, I. Improving pain assessment in mice and rats with advanced videography and computational approaches. **Pain**, v. 161, n. 7, p. 1420-1424, 2020. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001843.

GKROUZOUDI, A.; TSINGOTJIDOU, A.; JIRKOF, P. A systematic review on the reporting quality in mouse telemetry implantation surgery using electrocardiogram recording devices, **Physiology & Behavior**, v. 244, 113645, 2022.

HAWKINS, P.; BERTELSEN, T. 3Rs-Related and Objective Indicators to Help Assess the Culture of Care. **Animals (Basel)**, v. 9, n. 11, p. 1-7, 2019. doi: 10.3390/ani9110969. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113645>.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice, **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139-146, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>.

JIRKOF, P.; FLEISCHMANN, T.; CESAROVIC, N.; RETTICH, A.; VOGEL, J.; ARRAS, M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. **Lab Anim**, v.47, p. 153–16, 2013.

JUKAN, A.; MASIP-BRUIJN, X.; AMLA, N. Smart Computing and Sensing Technologies for Animal Welfare: A Systematic Review. **ACM Comput. Surv.**, v. 50, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1145/3041960>.

KRAMER, K.; KINTER, L.; BROCKWAY, B. P.; VOSS, H. P.; REMIE, R.; VAN ZUTPHEN, B. L. The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 40, n. 1, p. 8–16, 2001.

KRAMER, K.; VOSS, H. P.; GRIMBERGEN, J. A.; MILLS, P. A.; HUETTEMAN, D.; ZWIERS, L.; BROCKWAY, B. Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study. **Laboratory animals**, v. 34, n. 3, 272–280, 2000. <https://doi.org/10.1258/002367700780384663>.

LANGFORD, D.; BAILEY, A.; CHANDA, M.; CLARKE, S.; DRUMMOND, T.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R.; SOTOCINAL, S.; TABAKA, J.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.M.M.; FERRARI, M.; CRAIG, K.; MOGIL, J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, p. 447, 2010. 10.1038/nmeth.1455

LEACH, M. C.; KLAUS, K.; MILLER, A. L.; SCOTTO DI PERROTOLO, M.; SOTOCINAL, S. G.; FLECKNELL, P. A. The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, e35656, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035656>

LU, Y.; MAHMOUD, M.; ROBINSON, P. Estimating sheep pain level using facial action unit detection. *In: IEEE International Conference on Automatic Face & Gesture Recognition (FG 2017)* (pp. 394–399). Washington DC, USA, 2017. doi:10.1109/FG.2017.56

MATTA, J. A.; CORNETT, P. M.; MIYARES, R. L.; ABE, K.; SAHIBZADA, N.; AHERN, G. P. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, p. 8784–8789, 2008.

MITCHELL, A. Z.; MCMAHON, C.; BECK, T. W.; SARAZAN, R. D. Sensitivity of two noninvasive blood pressure measurement techniques compared to telemetry in cynomolgus monkeys and beagle dogs. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 62, n. 1, 54–63, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.005>

NAWROTH, C.; TOBIAS, K. E. The Academic, Societal and Animal Welfare Benefits of Open Science for Animal Science. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

O'NEIL, P. J.; KAUFMAN, L. N. Effects of indwelling arterial catheters or physical restraint on food consumption and growth patterns of rats: advantages of noninvasive blood pressure measurements techniques. **Lab. Anim. Sci**, v. 40, p. 641–643, 1990.

SILVA, J. M.; PONTES, A. N.; SARGES, K.; FERREIRA, M. L. Inovação e a ciência em animais de laboratório para pesquisas em saúde. *In*: SILVA, A. R.; SILVA, J. M.; SÓSTENES, E. Organizadores. **Comunicação e inovações tecnológicas na saúde**. Arapiraca: Eduneal, 2021. 109 p.

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H.; MARTIN, L. J.; WIESKOPF, J. S.; MAPPLEBECK, J. C. S.; WEI, P.; ZHAN, S.; ZHANG, S.; MCDUGALL, J. J.; KING, O. D.; MOGIL, J. S. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain**, v.7, p. 55, 2011.

TANNER, R. The 3Rs: What are Medical Scientists Doing about Animal Testing? **Front. Young Minds**, v. 6, n. 44, 2018. doi: 10.3389/frym.2018.00044.

TUTTLE, A. H.; MOLINARO, M. J.; JETHWA, J. F. *et al.* A deep neural network to assess spontaneous pain from mouse facial expressions. **Molecular Pain**, January 2018. doi:10.1177/1744806918763658.

USA TODAY. **Let's continue animal testing**: America's scientific community. Disponível em: <https://www.usatoday.com/story/opinion/2018/06/20/lets-continue-animal-testing-americas-scientific-community/718331002/>

VIDAL, A.; JHA, S.; HASSLER, S.; PRICE, T.; BUSSO, C. Face detection and grimace scale prediction of white furred mice. **Machine Learning with Applications**, v. 8, 100312, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mlwa.2022.100312>.

WELLINGTON, D.; MIKAELIAN, I.; SINGER, L. Comparison of ketamine–xylazine and ketamine–dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance in rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci.**, v. 52, p. 481–487, 2013. pmid:23849447