

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/01/2024.



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

Renata Haddad Pinho

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

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

Orientador: Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu
2022

Renata Haddad Pinho

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

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

Orientador: Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu
2022

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

Pinho, Renata Haddad.

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

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

Orientador: Stelio Pacca Loureiro Luna
Capes: 50501011

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

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

RENATA HADDAD PINHO

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

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

Comissão examinadora:

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

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

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

Prof. Dr. Pablo Ezequiel Otero
Universidad de Buenos Aires

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos colaboradores do projeto, pela dedicação ao estudo.

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

PINHO, R.H. **Responsiveness, reliability and the influence of a human observer in the pain assessment by facial expressions in rabbits** 38 p.
Thesis (PhD) – Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, 2022.

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão facial de um coelho sem (a) e com dor (b).....	19
Figura 2 - Exemplo de escores da Rabbit Grimace Scale.....	20
Figura 3 - Gráficos de frequência de ocorrência dos escores de cada item e dados perdidos da Rabbit Grimace Scale.....	24
Figura 4 – Gráficos de caixas da responsividade da Rabbit Grimace Scale.....	25

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

CI – intervalo de confiança

cm – centímetro

cm³ – centímetro cúbico

CO₂ – gás carbônico

FAU – unidade de ação facial

h – hora

ICC – coeficiente de correlação intraclasse

IM – intramuscular

IV – intravenosa

Kg – quilograma

L – litro

MA – todos os momentos agrupados

mg – miligrama

µg – micrograma

min – minuto

ml – mililitro

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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