

Impacto do sexo e das condições ambientais nas respostas do peixe-zebra à dor

Impact of sex and environmental conditions on the responses to pain in zebrafish

Gerlânia Oliveira Leite¹, Sacha Aubrey Alves Rodrigues Santos¹, Antônia Deyse de Castro Ribeiro¹, Francisca Magnólia Diógenes Holanda Bezerra¹, Adriana Rolim Campos¹

DOI 10.5935/2595-0118.20210018

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: O peixe-zebra adulto (*Danio rerio*) tem sido proposto como uma alternativa simples e de baixo custo ao uso de roedores em pesquisas laboratoriais de novos compostos com potencial antinociceptivo. Este estudo teve como objetivo avaliar se há influência do sexo do animal e do ambiente de teste no comportamento nociceptivo orofacial do peixe-zebra adulto.

MÉTODOS: Inicialmente, cinamaldeído, mentol, capsaicina, solução salina ácida ou glutamato foi aplicada nos lábios do peixe-zebra adulto masculino ou feminino. Grupos naïve foram incluídos como controle. A nocicepção orofacial foi quantificada em termos de atividade locomotora. Em outra série de experimentos, foi avaliado se o aparato, aclimatação, período de teste, temperatura da água e cor do campo aberto alterariam a resposta nociceptiva ao cinamaldeído.

RESULTADOS: O comportamento nociceptivo não dependeu do sexo do animal, do equipamento de teste, do horário em que o teste foi realizado ou da cor do campo aberto. No entanto, a aclimatação promoveu comportamento nociceptivo em animais naïve e não alterou promoveu comportamento nociceptivo em animais naïve e não alterou a resposta nociceptiva ao cinamaldeído ($p < 0,01$ vs naïve aclimatado). O comportamento nociceptivo foi verificado apenas quando o teste foi executado a uma temperatura de 26°C ($p < 0,01$ vs naïve).

CONCLUSÃO: Os resultados sugerem a necessidade de controlar o ambiente e a temperatura da água como fonte de variação ambiental durante o teste de comportamento nociceptivo do peixe-zebra adulto.

Descritores: Dor, Meio ambiente, Nocicepção, Peixe-Zebra.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Adult zebrafish (*Danio rerio*) has been proposed as a low-cost and simple alternative to the use of rodents in laboratory research on novel compounds with antinociceptive potential. This study aimed to assess whether there is an influence of animal sex and the test environment on the orofacial nociceptive behavior of the adult zebrafish.

METHODS: First, cinnamaldehyde, menthol, capsaicin, acidic saline or glutamate was applied into the lips of the adult male or female zebrafish. Naïve groups were included as control. The orofacial nociception was quantified in terms of locomotor activity. In other series of experiments, it was evaluated whether the apparatus, acclimatization, period of test, temperature of the water and color of the open field would alter the nociceptive response to cinnamaldehyde.

RESULTS: The nociceptive behavior did not depend on the sex of the animal, apparatus, time the test was performed or the color of the open field. However, acclimatization promoted nociceptive behavior in naïve animals and did not alter the nociceptive response to cinnamaldehyde ($p < 0.01$ vs acclimatized naïve). The nociception behavior was presented only when the test was performed at a temperature of 26°C ($p < 0.01$ vs naïve).

CONCLUSION: The results suggest the need to control the environment and water temperature as an environmental source of variation during the nociceptive behavior test of the adult zebrafish.

Keywords: Environment, Pain, Nociception, Zebrafish.

INTRODUÇÃO

A dor é considerada um estado afetivo negativo associado a lesões em tecidos e é importante aliviar a dor para melhorar tanto a condição humana quanto o bem-estar animal^{1,2}. Embora modelos de roedores sejam amplamente utilizados na pesquisa da dor translacional^{3,4}, outros modelos experimentais ajudam a avaliar os mecanismos evolutivamente conservados subjacentes à nocicepção e seus fenótipos comportamentais associados^{5,6}.

Gerlânia Oliveira Leite – <https://orcid.org/0000-0003-1532-6831>;
Sacha Aubrey Alves Rodrigues Santos – <https://orcid.org/0000-0002-4117-2277>;
Antônia Deyse de Castro Ribeiro – <https://orcid.org/0000-0002-1183-8074>;
Francisca Magnólia Diógenes Holanda Bezerra – <https://orcid.org/0000-0002-7671-3002>;
Adriana Rolim Campos – <https://orcid.org/0000-0002-7355-9310>.

1. Universidade de Fortaleza, Núcleo de Biologia Experimental, Fortaleza, CE, Brasil.

Apresentado em 09 de novembro de 2020.

Aceito para publicação em 28 de dezembro de 2020.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: CAPES/FUNCAP, CNPq e Fundação Edson Queiroz.

Endereço para correspondência:

Adriana Rolim Campos
Universidade de Fortaleza
Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX)
Av. Washington Soares, 1321 – Edson Queiroz
60811-905 Fortaleza, CE, Brasil.
E-mail: adrirolim@unifor.br

Já foi demonstrado que o peixe-zebra adulto (*Danio rerio*) é uma alternativa viável aos modelos de laboratório mais tradicionais utilizados na busca de novos compostos com potencial antinociceptivo⁷ com as vantagens de ter uma homologia significativa para o genoma humano e um custo relativamente menor em comparação com os roedores^{7,8}. Entretanto, tanto quanto se sabe, não há estudos que avaliem a relação entre o ambiente de teste e o comportamento nociceptivo do peixe-zebra, bem como se há ou não interferência do sexo do animal. Sabe-se, por exemplo, que a temperatura da água altera a resposta convulsiva do peixe-zebra ao pentilenotetrazol⁹. O estudo¹⁰ demonstrou que a atividade locomotora das larvas de peixe-zebra é sensível à hora do dia e às condições de luz.

De acordo com outro estudo¹¹ sobre o neurocomportamento do peixe-zebra, o sexo muitas vezes não é relatado e o uso de modelos de roedores tanto quanto de modelos novos (peixe-zebra) pode contribuir para a compreensão dos mecanismos que ligam o sexo ao cérebro e ao comportamento. Já foi demonstrado que a resposta nociceptiva corneana induzida pela solução salina hipertônica no peixe-zebra adulto é independente do sexo do animal¹². Os autores¹³ também relataram que não houve interferência do sexo na resposta nociceptiva ao ácido acético administrado nos lábios do peixe-zebra. Entretanto, tanto a solução salina hipertônica quanto o ácido acético promovem o comportamento nociceptivo por meio de mecanismos não específicos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se existe uma influência do sexo do animal e do ambiente de teste no comportamento orofacial nociceptivo do peixe-zebra adulto.

MÉTODOS

Peixe-zebra selvagem adulto (*Danio rerio*) de ambos os sexos, fenótipo de barbatana curta, com 60-90 dias, tamanho (3,5±0,5cm) e peso (0,3±0,2g), semelhantes obtido da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Fortaleza, Ceará, Brasil). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24h em um tanque de vidro 10-L (30x15x20cm) contendo água de torneira sem cloro (ProtecPlus[®]) e bomba de ar com filtro submerso a 25°C e pH 7,0, em ritmo circadiano quase normal (14:10h de luz/escuro). Os peixes receberam ração *ad libitum* 24h antes das experiências.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO NO COMPORTAMENTO OROFACIAL NOCICEPTIVO DO PEIXE-ZEBRA ADULTO

Comportamento nociceptivo orofacial induzido por cinamaldeído

A nociceção orofacial foi induzida por cinamaldeído (TRPA1 - canal receptor de potencial transitório catiônico subfamília A membro 1 - agonista específico; 0,66 µg/mL; 5,0 µL) injetado nos lábios dos animais (macho e fêmea; n=8/grupo), 30 min após pré-tratamento com solução salina (20,0µL). Grupos naive (macho e fêmea, n=8/cada) foram incluídos como controle. Os animais foram então colocados em uma placa de Petri de vidro (10x15cm) dividida em quadrantes e a resposta nociceptiva foi quantificada em termos de atividade locomotora (número de linhas de cruzamento) realizada durante 0 - 5 min.

Comportamento nociceptivo orofacial induzido por mentol

A nociceção orofacial foi induzida por mentol (TRPM8 - canal receptor de potencial transitório catiônico subfamília M membro 8 - agonista; 1,2mM; 5,0µL) injetado nos lábios dos animais (macho e fêmea; n=8/grupo) 30 min após pré-tratamento com solução salina (20,0µL). Grupos naive (macho e fêmea, n=8/cada) foram incluídos como controle. O comportamento nociceptivo foi quantificado em termos de atividade locomotora (número de linhas de cruzamento) realizada durante 0 - 10 min.

Comportamento nociceptivo orofacial induzido por capsaicina

A nociceção orofacial foi induzida por capsaicina (TRPV1 - canal receptor de potencial transitório catiônico subfamília V membro 1 - agonista; 40,93µM; 5,0µL), dissolvida em etanol, PBS (tampão fosfato-salino) e água destilada (1:1:8) injetada nos lábios dos animais (macho e fêmea; n=8/grupo) 30 min após pré-tratamento com solução salina (20,0µL). Grupos naive (macho e fêmea, n=8/cada) foram incluídos como controle. O comportamento nociceptivo foi quantificado em termos de atividade locomotora (número de linhas de cruzamento) realizada durante 10 - 20 min.

Comportamento nociceptivo orofacial induzido por solução salina ácida

A nociceção orofacial foi induzida por solução salina ácida (ASIC - canais iônicos sensíveis a ácidos - agonista; 0,1%; 5,0µL) injetado nos lábios dos animais (macho e fêmea; n=8/grupo) 30 min após pré-tratamento com solução salina (20,0µL). Grupos naive (macho e fêmea, n=8/cada) foram incluídos como controle. O comportamento nociceptivo foi quantificado em termos de atividade locomotora (número de linhas de cruzamento) realizada durante 10 - 20 min.

Comportamento nociceptivo orofacial induzido por glutamato

A nociceção orofacial foi induzida por glutamato (receptor NMDA - N-metil-D-aspartato - agonista; 12,5mM; 5,0µL) injetado nos lábios dos animais (macho e fêmea; n=8/grupo) 30 min após o pré-tratamento com solução salina (20,0µL). Grupos naive (macho e fêmea, n=8/cada) foram incluídos como controle. O comportamento nociceptivo foi quantificado em termos de atividade locomotora (número de linhas de cruzamento) realizada durante 0 - 10 min.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AMBIENTE DE TESTE NO COMPORTAMENTO OROFACIAL NOCICEPTIVO DO PEIXE-ZEBRA ADULTO

Comportamento nociceptivo orofacial induzido por cinamaldeído

A nociceção orofacial foi induzida com cinamaldeído (já descrito) injetado nos lábios dos animais (n=8/grupo), 30min após o pré-tratamento salino (20,0µL). Grupos naive (n=8/cada) foram incluídos como controle. O comportamento nociceptivo foi analisado como já descrito durante zero - 5 min nas seguintes condições:

- Teste realizado em placa de Petri (10x15cm) ou béquer (250mL); neste teste, grupos (n=8/cada);
- Teste realizado em placa de Petri com animais aclimatados ou não 24h antes dos experimentos;

- Teste realizado em placa de Petri com horários diferentes do experimento (manhã ou tarde);
- Teste realizado em placa de Petri com diferentes temperaturas da água: 22, 26 ou 30° C;
- Teste realizado em placa de Petri com fundo claro ou escuro.

Todo o procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; #7210149/2016).

Análise estatística

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meios da análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando

o software *GraphPad Prism 6.0* (*GraphPad Prism Software Inc.*, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Cinamaldeído- ($p < 0,01$ - $p < 0,001$ vs naive), mentol- ($p < 0,05$ vs naive), capsaicina- ($p < 0,001$ - $< 0,0001$ vs naive), solução salina ácida ($p < 0,0001$ vs naive) e glutamato- ($p < 0,001$ - $p < 0,0001$ vs naive) induziram comportamento nociceptivo no peixe-zebra adulto e este efeito não foi dependente do sexo (Figura 1).

Influência do ambiente de teste sobre o comportamento orofacial nociceptivo do peixe-zebra adulto

O cinamaldeído induziu comportamento orofacial nociceptivo quando os animais foram testados em placa de Petri ($p < 0,05$ vs naive) e

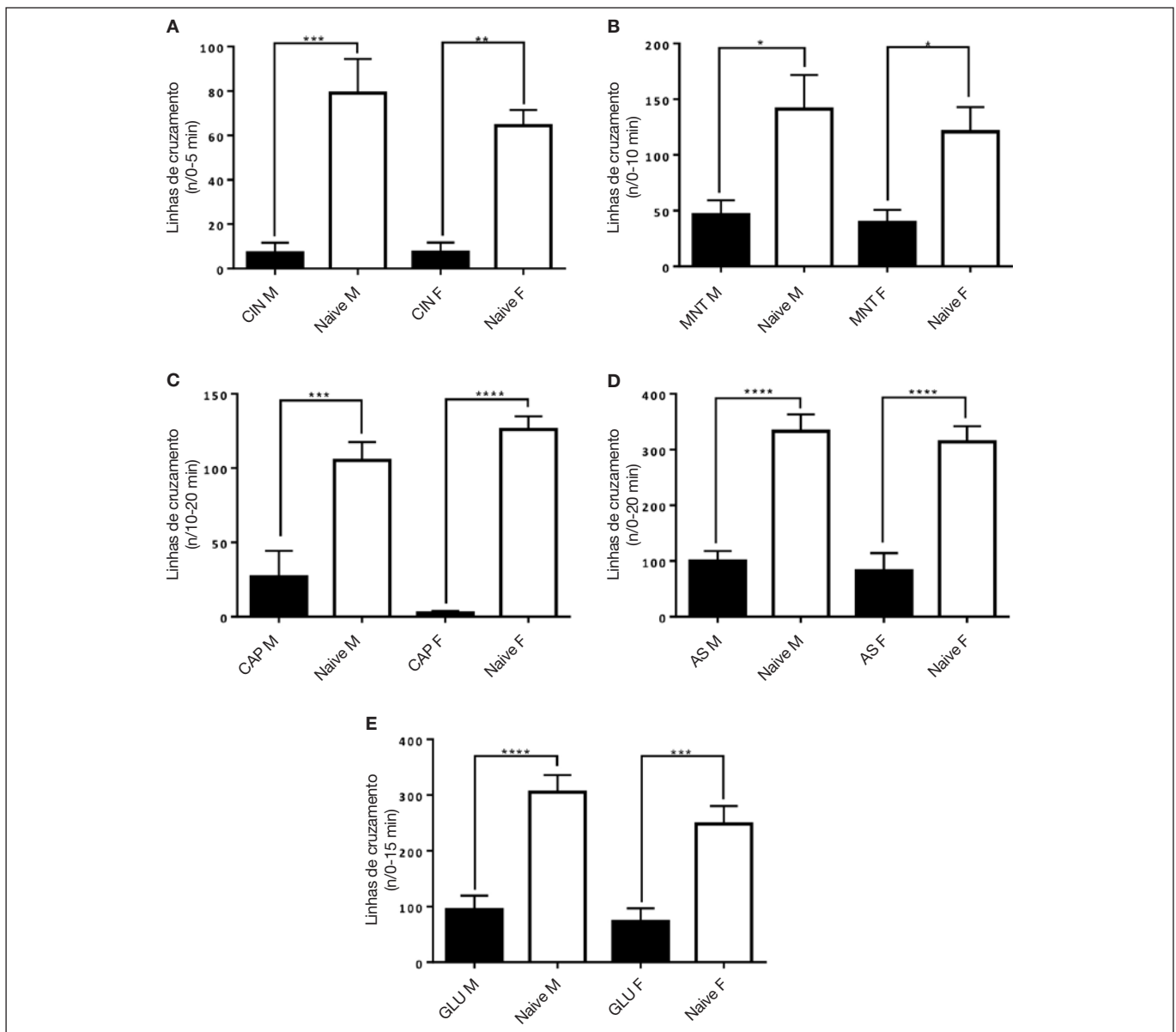


Figura 1. Comportamento nociceptivo orofacial induzido pelo cinamaldeído (CIN - A), mentol (MNT - B), capsaicina (CAP - C), solução salina ácida (AS - D) ou glutamato (GLU - E) em peixe-zebra adulto macho (M) e fêmea (F). Os resultados são expressos como valores médios ± erro padrão. ANOVA seguida de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ vs o respectivo grupo estimulado.

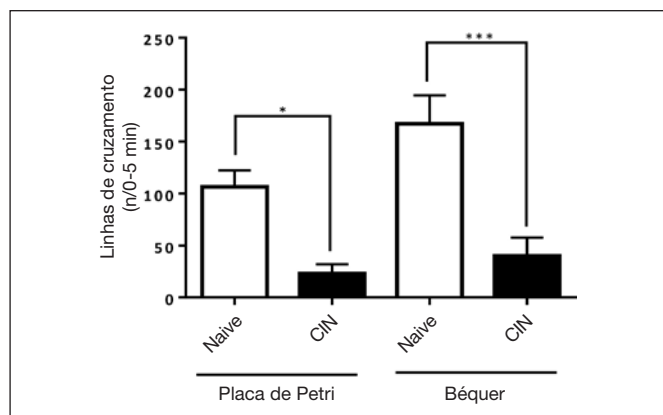


Figura 2. Comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído (CIN) em peixe-zebra adulto macho e fêmea para teste realizado na placa de Petri (A) ou béquer (B). Os resultados são expressos como valores médios ± erro padrão. ANOVA seguida de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 vs o respectivo grupo estimulado.

béquer (p<0,01 vs naive), como descrito na figura 2. Houve resposta nociceptiva quando o teste foi realizado pela manhã (p<0,01 vs naive) ou pela tarde (p<0,05 vs naive), como mostrado na figura 3B. Se os animais foram aclimatados ou não 24h antes do teste interferiu na resposta nociceptiva, já que os animais naive aclimatados mostraram comportamento nociceptivo (p<0,05) como o apresentado pelos peixes tratados com cinamaldeído (p<0,01) em comparação com os animais naive não aclimatados (Figura 3A). A temperatura da água na qual foi possível verificar o comportamento nociceptivo foi de 26° C (p<0,0001 vs naive - Figura 4A). Não houve diferença na resposta quando o teste foi realizado em placas Petri com fundo branco (p<0,001 vs naive) ou preto (p<0,01 vs naive) (Figura 4B).

DISCUSSÃO

O uso do peixe-zebra adulto como modelo animal de nocicepção provou-se eficiente como ferramenta para o estudo de novos alvos

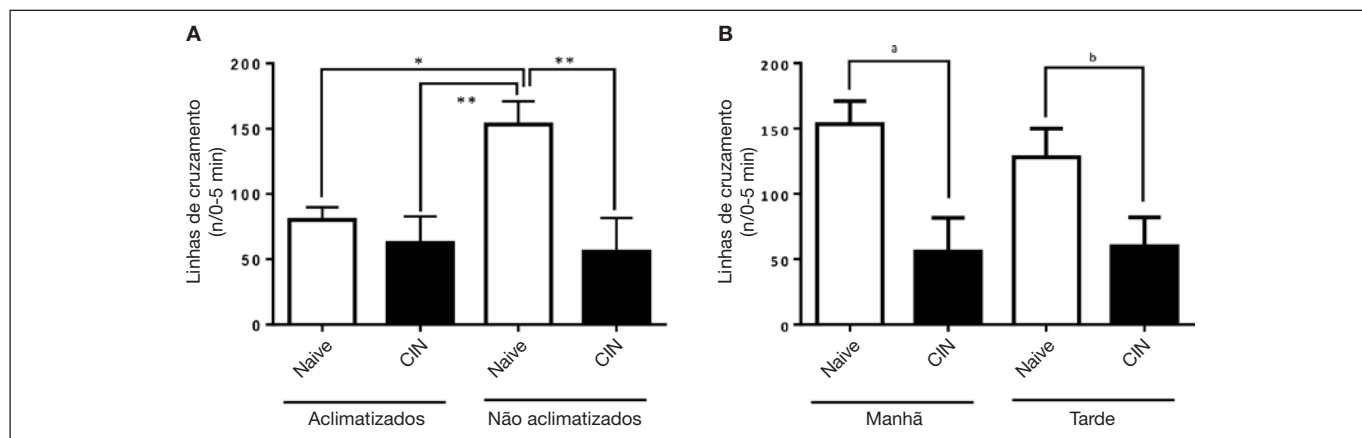


Figura 3. Avaliação da interferência da aclimação (A) e período do teste (B) sobre o comportamento nociceptivo induzido pelo cinamaldeído (CIN) em peixe-zebra adulto macho e fêmea. Os resultados são expressos como valores médios ± erro padrão. ANOVA seguida de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 vs o respectivo grupo estimulado.

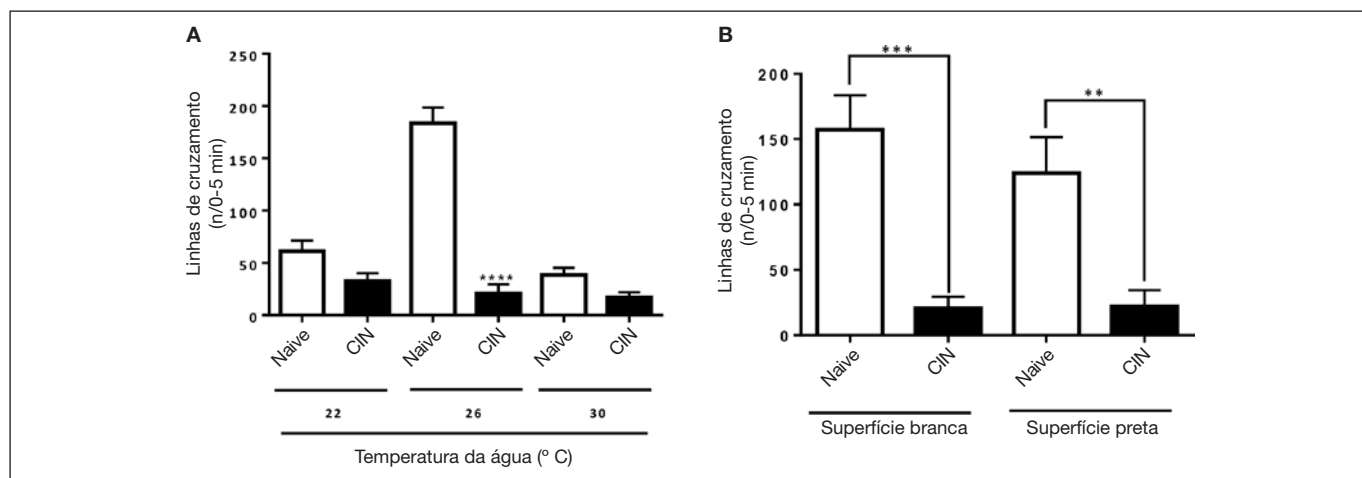


Figura 4. Avaliação da interferência da temperatura da água (A) e da cor do campo aberto (B) no comportamento nociceptivo induzido pelo cinamaldeído (CIN) no peixe-zebra adulto macho e fêmea. Os resultados são expressos como valores médios ± erro padrão. ANOVA seguida de Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 vs o respectivo grupo estimulado.

farmacológicos¹⁴⁻¹⁹. A diminuição da atividade locomotora é um dos parâmetros da nocicepção no peixe-zebra⁵ e foi utilizada neste caso. Para promover a precisão na tradução dos resultados da pesquisa utilizando o peixe-zebra, várias particularidades da biologia deste devem ser consideradas⁹. Aqui, foi avaliado o efeito do sexo e mudanças no ambiente de teste no comportamento nociceptivo orofacial do peixe-zebra adulto.

Há poucos fatores de confusão no comportamento nociceptivo do peixe-zebra adulto, já que a aclimação 24h antes do teste e a temperatura da água foram os únicos parâmetros que alteraram a resposta dos animais. Assim, como no peixe-zebra adulto, a temperatura do ambiente de teste é um fator chave na variação da resposta nociceptiva dos roedores^{20,21}.

Tem sido relatado que existe uma diferença entre a atividade locomotora do peixe-zebra macho e fêmea^{22,23}. Como o parâmetro de nocicepção utilizado foi a atividade locomotora, foi investigado se haveria interferência do sexo do animal no comportamento nociceptivo.

A influência do sexo no comportamento nociceptivo em modelos animais tem sido amplamente demonstrada e parece que as fêmeas têm hiperresponsividade, embora não haja diferença entre os sexos em algumas espécies de roedores²⁴. Aqui, uma relação entre o sexo do animal e a resposta nociceptiva, como relatado anteriormente, não foi verificada^{12,13,25}.

Os testes comportamentais utilizando peixe-zebra são baseados em confrontar o animal com um novo ambiente, experimentando o conflito entre o desejo de explorar a área/objeto desconhecido, a curiosidade e a motivação para evitar perigos potenciais^{8,25}. O comportamento nociceptivo não foi alterado pelo tamanho do aparelho, tempo ou cor da placa de Petri na qual o teste foi realizado.

O estudo²⁶ comparou a atividade locomotora do peixe-zebra adulto em dois campos abertos de tamanhos diferentes e constatou que a atividade locomotora foi maior na arena maior. Esperava-se que os animais testados no béquer mostrassem maior atividade locomotora do que os animais testados na placa de Petri. Tanto os animais testados no béquer quanto os testados na placa de Petri apresentaram comportamento nociceptivo. Embora o comportamento nociceptivo tenha sido mais significativo no béquer, não houve diferença entre os comportamentos apresentados no béquer e na placa de Petri. Vários estudos têm analisado se a atividade locomotora de embriões e larvas de peixe-zebra é alterada em diferentes momentos do dia. Os autores²⁷ demonstraram que a atividade dos embriões e larvas era mais variável durante esses períodos, enquanto que a atividade era mais alta e menos variável à tarde. O estudo¹⁰ relatou maior movimento das larvas pela manhã. Entretanto, outros estudos²⁸ concluíram que a hora do dia não alterou sua atividade. Embora o peixe-zebra adulto seja conhecido por ser mais ativo pela manhã²⁹, não foi encontrada diferença entre as respostas nociceptivas do peixe-zebra adulto testado pela manhã e à tarde.

A cor de outros equipamentos usados na pesquisa neurocomportamental, incluindo redes e béqueres de tratamento, raramente é relatada na literatura e pode desempenhar um papel³⁰. O peixe-zebra tem visão colorida³¹ e sua fisiologia visual é geralmente como a dos mamíferos³², tornando o peixe-zebra uma ferramenta útil para estudar o impacto das cores no comportamento³⁰. Cores diferentes podem afetar a percepção subjetiva da dor³³, mas aqui, usando o parâmetro de cor em campo aberto, não houve diferença na res-

posta nociceptiva do peixe-zebra quando testado em campo aberto branco ou preto.

Foi mostrado anteriormente que o peixe-zebra adulto rapidamente demonstra (dentro de 5 min) o aprendizado de habituação no teste de campo aberto³⁴. A aclimação induziu o comportamento nociceptivo no peixe-zebra *naive* como animais recebendo cinamaldeído. Os peixes não aclimatados apresentaram alta atividade locomotora, sugerindo a existência de mecanismos adaptativos no peixe-zebra que inibem a nocicepção em situações de ameaça e a liberam em situações de novidade ou expectativa³⁵.

O efeito nociceptivo é observado na temperatura da água de 26° C, enquanto, quando os animais são testados na temperatura da água de 22° e 30° C, não houve comportamento nociceptivo. Este resultado corrobora as conclusões anteriores⁹, confirmando a necessidade de manter a temperatura da água como fator determinante para o manejo do peixe-zebra, já que as variações na temperatura ambiental afetam fortemente a biologia dos peixes influenciando não somente o crescimento, mas também a reprodução, a atividade espontânea e o metabolismo³⁶.

CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados sugerem a necessidade de controlar o ambiente e a temperatura da água durante o teste de comportamento nociceptivo do peixe-zebra adulto.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Gerlânia Oliveira Leite

Coleta de Dados, Investigação, Redação – Preparação do original

Sacha Aubrey Alves Rodrigues Santos

Coleta de Dados

Antônia Deyse de Castro Ribeiro

Coleta de Dados

Francisca Magnólia Diógenes Holanda Bezerra

Coleta de Dados

Adriana Rolim Campos

Aquisição de financiamento, Gerenciamento de Recursos, Supervisão

REFERÊNCIAS

1. Mogil JS, Davis KD, Derbyshire SW. The necessity of animal models in pain research. *Pain*. 2010;151(1):12-7.
2. Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010;120(11):3742-4.
3. Stevenson GW, Bilsky EJ, Negus SS. Targeting pain-suppressed behaviors in preclinical assays of pain and analgesia: effects of morphine on acetic acid-suppressed feeding in C57BL/6J mice. *J Pain*. 2006;7(6):408-16.
4. Meotti FC, Coelho Idos S, Santos, AR. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. *J Pain*. 2010;11(6):570-8.
5. Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ. Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. *J Pain*. 2003;4(8):431-40.
6. Du X, Yuan B, Wang J, Zhang X, Tian L, Zhang T, et al. Effect of heat-reinforcing needling on serum metabolite profiles in rheumatoid arthritis rabbits with cold syndrome. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2017;37(9):977-83.
7. Magalhães FEA, de Sousa CAPP, Santos SAAR, Meneses RB, Batista FLA, Abreu AO, et al. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish*. 2017;14(5):422-9.
8. Crusio WE. Genetic dissection of mouse exploratory behavior. *Behav Brain Res*. 2001;125(1-2):127-32.
9. Menezes FP, Da Silva RS. The Influence of temperature on adult zebrafish sensitivity to pentylenetetrazole. *Epilepsy Res*. 2017;135:14-8.
10. MacPhail RC, Brooks J, Hunter DL, Padnos B, Irons TD, Padilla S. Locomotion

- in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*. 2008;30(1):52-8.
11. Genario R, de Abreu MS, Giacomini ACVV, Demin K, Kalueff AV. Sex differences in behavior and neuropharmacology of zebrafish. *Eur J Neurosci*. 2020;52(1):2586-603.
 12. Magalhães FEA, Batista FLA, Lima LMG, Abrante IA, de Araújo JIF, Santos SAAR, et al. Adult zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of corneal antinociceptive Compounds. *Zebrafish*. 2018;15(6):566-74.
 13. Dewberry S, Taylor C, Yessick L, Totsch S, Watts S, Sorge R. Development and validation of a partially automated model of inflammatory chronic pain in zebrafish. *J Pain*. 2016;17(4):S50.
 14. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 2006;124(6):1269-82.
 15. Nascimento JET, Morais SM, Lisboa DS, Oliveira Sousa M, Santos SAAR, Magalhães FEA, et al. The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Oureatea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biomed Pharmacother*. 2018;107:1030-6.
 16. Santos ALE, Leite GO, Carneiro RF, Roma RR, Santos VF, Santos MHC, et al. Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2019;664:149-56.
 17. Soares ICR, Santos SAAR, Coelho RF, Alves YA, Vieira-Neto AE, Tavares KCS, et al. Oleonic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. *Chem Biol Interact*. 2019;299:37-43.
 18. Lima MDCL, de Araújo JIF, Gonçalves Mota C, Magalhães FEA, Campos AR, da Silva PT, et al. Antinociceptive effect of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* (female) leaves on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2020;17(2):112-9.
 19. Silva LMRD, Lima JDSS, Magalhães FEA, Campos AR, Araújo JIF, Batista FLA, et al. Graviola fruit bar added acerola by-product extract protects against inflammation and nociception in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Med Food*. 2020;23(2):173-80.
 20. Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain*. 1991;45(2):211-6.
 21. Pincédé I, Pollin B, Meert T, Plaghki L, Le Bars D. Psychophysics of a nociceptive test in the mouse: ambient temperature as a key factor for variation. *PLoS One*. 2012;7(5):e36699.
 22. Philpott C, Donack CJ, Cousin MA, Pierret C. Reducing the noise in behavioral assays: sex and age in adult zebrafish locomotion. *Zebrafish*. 2012;9(4):191-4.
 23. Ariyomo TO, Watt PJ. Effect of hunger level and time of day on boldness and aggression in the zebrafish *Danio rerio*. *Fish Biol*. 2015;86(6):1852-9.
 24. Korzeniewska OA, Khan J, Tao Y, Eliav E, Benoliel R. Effects of sex and stress on trigeminal neuropathic pain-like behavior in rats. *J Oral Facial Pain Headache*. 2017;31(4):381-97.
 25. Steimer T, Driscoll P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically select Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*. 2003;6(2):87-100.
 26. Stewart AM, Gaikwad S, Kyzar E, Kalueff AV. Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. *Brain Res*. 2012;1451:44-52.
 27. Kristofco LA, Cruz LC, Haddad SP, Behra ML, Chambliss CK, Brooks CW. Age matters: developmental stage of *Danio rerio* larvae influences photomotor response thresholds to diazinon or diphenhydramine. *Aquat Toxicol*. 2016;170:344-54.
 28. Fitzgerald JA, Kirla, KT, Zinner CP, Vom Berg CM. Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Sci Rep*. 2019;9(1):13647.
 29. Sykes DJ, Suriyampola PS, Martins EP. Recent experience impacts social behavior in a novel context by adult zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*. 2018;13(10):e0204994.
 30. de Abreu MS, Giacomini ACVV, Genario R, Dos Santos BE, Marcon L, Demin KA, et al. The impact of housing environment color on zebrafish anxiety-like behavioral and physiological (cortisol) responses. *Gen Comp Endocrinol*. 2020;294:113499.
 31. Zimmermann MJY, Nevala NE, Yoshimatsu T, Osorio D, Nilsson DE, Berens P, et al. Zebrafish differentially process color across visual space to match natural scenes. *Curr Biol*. 2018;28(13):2018-32.e5.
 32. Meier A, Nelson R, Connaughton VP. Color processing in zebrafish retina. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:327.
 33. Wiercioch-Kuzianik K, Babel P. Color hurts. The effect of color on pain perception. *Pain Med*. 2019;20(10):1955-62.
 34. Champagne DL, Hoefnagels CCM, Kloet RE, Richardson MK. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):332-42.
 35. Maximino C. Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. *Psychol Neurosci*. 2011;4(1):149-55.
 36. Angiulli E, Pagliara V, Cioni C, Frabetti F, Pizzetti F, Alleva E, Toni M. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety, and social preference in *Danio rerio*. *Sci Rep*. 2020;10(1):5385.