

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 26/10/2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Isabela Gertrudes Batalhão

Efeitos do metilfenidato sobre o sistema dopaminérgico, comportamento
e estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus*

São José do Rio Preto

2018

Isabela Gertrudes Batalhão

Efeitos do metilfenidato sobre o sistema dopaminérgico, comportamento
e estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Co-orientador: Dr. Danilo Grunig Humberto Silva

São José do Rio Preto
2018

Batalhão, Isabela Gertrudes.

Efeitos do metilfenidato sobre o sistema dopaminérgico, comportamento e estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus* / Isabela Gertrudes Batalhão. – São José do Rio Preto, 2018
108 f.: il., tabs.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Coorientador: Danilo Grunig Humberto Silva

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Ictiologia. 3. Agressividade. 3. Marcadores bioquímicos. 4. Neurotransmissores. 5. Fármaco. I. Título.

CDU – 597

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Isabela Gertrudes Batalhão

Efeitos do metilfenidato sobre o sistema dopaminérgico,
comportamento e estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biociências,
junto ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
FURB – Campus Blumenau
Orientador

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
USP - Campus Baixada Santista

Prof. Dr. Juliane Silberschmidt Freitas
USP- São Carlos

Profa. Dra. Lilian Casatti
UNESP – Campus São José do Rio Preto

Prof. Dra. Rejane Maira Góes
UNESP – Campus São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de outubro de 2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática – LABCA, junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, campus de São José do Rio Preto, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Dedico este trabalho aos meus pais, Edson e Eliana, meus exemplos de amor, respeito e educação. Dedico à minha irmã Jaqueline, que é meu orgulho, minha confidente e meu anjo da guarda, e também ao meu cunhado João Paulo que veio para completar a nossa família. Obrigada pelo amor incondicional e por me apoiarem em todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

- À Deus pela vida e por me confiar esse caminho, e por me mostrar que é na fraqueza que a força se realiza plenamente
- Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, por ser um exemplo de pessoa, educador e pesquisador a ser seguido. Agradeço pela paciência que teve comigo em todos esses anos e por me incentivar a todo momento em seguir e me fazer acreditar que no final sempre dá certo!
- Ao meu co-orientador e grande amigo, Dr. Danilo Grunig Humberto Silva, por ser um exemplo de pessoa e pesquisador. Obrigada, pelo apoio e ensinamentos em todas as etapas desse projeto.
- À Prof. Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas, pelo fornecimento dos peixes para realizar os experimentos. Aos técnicos, Rose e ao Carlos que me ajudaram em todas as coletas.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Lima, pela compreensão e gentileza ao dividir o laboratório conosco.
- Ao Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy, por conceder o espaço no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI/UFSC) para realizar as análises moleculares
- Aos meus colegas de trabalho do LABCA pela ajuda nas semanas de experimento, nos dias de coleta e na execução das análises. Em especial, a minha amiga Priscila que me ajudou em todas as etapas do trabalho.
- Às queridas químicas Dani e Milena, que foram um presente do LABCA para a vida. Obrigada pela amizade!
- À Dr^a Camila, por ter enriquecido não só o meu projeto com as análises comportamentais, mas também toda a minha vida profissional e pessoal. Obrigada, pela sua amizade e de toda a sua família.
- À querida Dr^a Daína Lima, que em momento nenhum mediu esforços para passar horas e mais horas na bancada comigo. Obrigada pelo incentivo diário, pelos ensinamentos, correções e amizade.
- Aos meus amigos da UFMS, Maíra, Bianca, Jéssika, Andréia, Guilherme e Cleiton que compartilham comigo desde 2007 esse amor em ser biólogo. Em especial, agradeço à Bianca e ao Cleiton, por me acompanharem em toda essa trajetória da vida de pós-graduanda.

- Às minhas tão amadas amigas, Gabriela, Fernanda e Ariane, que sempre confiaram em mim e sempre me acompanharam em todos os momentos da minha vida. Gabi e Fer, obrigada por me presentarem com o Maurício, Cecília e a minha tão doce Alice.

- À minha amiga e irmã Vivian, que me fortaleceu na oração a cada passo dessa caminhada, que sempre esteve comigo nos momentos bons e naqueles não tão bons, mas sempre fortalecendo a minha fé e me tornando uma pessoa melhor. Agradeço também, ao meu amigo Denilson, um homem de Deus que sempre me amparou me mostrando o caminho da verdade e da vida, que é DEUS.

- Aos meus queridos amigos, Ana Letícia, Alessandra, Natália, Crislene e Rafael, que passaram de amigos de profissão para amigos da vida. Obrigada por serem meus confidentes, minhas risadas diárias e meus amigos de verdade.

- Às minhas amigas de escolinha, Isa, Elo, Bruninha e Giu, que até hoje me proporcionam tantos momentos bons e de muitas risadas.

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Não vós inquieteis com nada! Em todas as circunstâncias apresentais a Deus as vossas preocupações, mediante a oração, as súplicas e a ação de graças. E a paz de Deus, que excede toda inteligência haverá de guardar vossos corações e vossos pensamentos, em Cristo Jesus.”

(Filipenses 4, 6-7)

RESUMO

A ocorrência de fármacos no meio aquático tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, causando efeitos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais em organismos aquáticos. Geralmente, a poluição aquática por fármacos ocorre como consequência das estações de tratamento de águas residuais (ETAR) não serem projetadas para remover completamente esses compostos dos efluentes, que por fim têm como destino as águas superficiais. O metilfenidato (MF, princípio ativo do medicamento ritalina®) é um estimulante do sistema nervoso central, recomendado para pessoas com transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), age inibindo os transportadores de recaptção da dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina; DA), afim de aumentar os níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica. Estudos já detectaram em efluentes a presença do MF e seu metabólito, o ácido ritalínico, em concentrações de ng.L^{-1} . Com isso, o presente trabalho avaliou os efeitos bioquímicos, moleculares e comportamentais que o MF, em concentrações ambientalmente relevantes, pode causar em machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Peixes machos foram expostos a 0, 20, 100 e 200 ng.L^{-1} de MF por 5 dias. Foram avaliados os efeitos do MF no comportamento agressivo, no sistema dopaminérgico e serotoninérgico, além nos níveis de transcritos de carboxilesterase e dos receptores de dopamina e na atividade da carboxilesterase (CbE) no encéfalo das tilápias expostas à concentração de 20 e 100 ng.L^{-1} de MF. Além disso, avaliamos enzimas do sistema de defesa antioxidante, enzimas de biotransformação, níveis de peroxidação lipídica e atividade das esterases no fígado e nas brânquias dos peixes expostos a 20, 100 e 200 ng.L^{-1} de MF. Os resultados mostraram que embora o MF aumente a agressividade dos animais, este efeito parece não estar diretamente relacionado ao sistema dopaminérgico dos animais, dada a diminuição das concentrações de DA e a ausência de alterações nos níveis de transcrição dos receptores de dopamina e tirosina hidroxilase. Também não foi relacionado a alterações nos níveis plasmáticos de testosterona. Sugerimos que o aumento da agressividade pode ser uma consequência de uma diminuição significativa nos níveis de 5-HT e DA no cérebro, diminuindo o medo e aumentando a ansiedade dos animais. Os resultados também mostraram que o efeito da exposição ao MF foi mais expressivo

nas brânquias do que no fígado das tilápias. Foi observado uma diminuição concentração-dependente tanto na atividade das enzimas antioxidantes como na atividade das acetilcolinesterase nas brânquias dos animais, o que pode ter deixado os animais mais suscetíveis ao estresse oxidativo e a efeitos de hiperestimulação do SNC, respectivamente. Observamos também, uma possível metabolização do fármaco devido ao aumento da CbE nas brânquias dos animais, porém, não houve alterações nas enzimas de biotransformação. A diminuição na peroxidação lipídica no fígado reforça a ausência de indução do sistema antioxidante mediante ao fármaco. Dessa forma, com o aumento do consumo global de diferentes classes de fármacos e a remoção incompleta desses compostos por ETAR, nossos resultados reforçam a importância de estudos que avaliem os riscos que os fármacos, em concentrações ambientalmente realísticas, podem causar em organismos não alvo, assim como, a importância de uma melhor eficiência na remoção dos fármacos pelos processos convencionais de tratamento dos efluentes.

Palavras-chave: fármaco, biomarcadores, neurotransmissores, agressividade, tilápias do Nilo

ABSTRACT

The occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment has increased in the last decades, causing biochemical, physiological and behavioral effects in aquatic organisms. In general, water pollution by pharmaceuticals occurs because wastewater treatment plants (WWTPs) are not planned to completely remove these compounds from effluents, releasing these compounds to the surface water. Methylphenidate (MF, main ingredient of ritalin®,) is a central nervous system stimulant, recommended for people with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), which acts inhibiting dopamine reuptake transporters (3,4-dihydroxyphenylethylamine; DA), in order to increase the levels of this neurotransmitter in the synaptic cleft. Studies have already detected the presence of MF and its metabolite, ritalinic acid, in effluents in the concentrations of ng.L^{-1} . Thus, the present study evaluated biochemical, molecular and behavioral effects that MF, in environmentally relevant concentrations, can cause in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Male fish were exposed to 0, 20, 100 and 200 ng.L^{-1} of MF for 5 days. We evaluated the effects of MF on aggressive behavior, dopaminergic and serotonergic system, in addition to the carboxylesterase and dopamine receptor transcript levels and carboxylesterase (CbE) activity in the brain of tilapias exposed to the concentration of 20 and 100 ng.L^{-1} of MF. Furthermore, we evaluated enzymes from the antioxidant defense system, biotransformation, lipid peroxidation levels and esterases activity in the liver and gills of fish exposed to 20, 100 and 200 ng.L^{-1} MF. The results showed that, although MF increases the aggressiveness of the animals, this effect does not appear to be directly related to the dopaminergic system of the animals, due to the decrease in DA levels and the absence of changes in the transcript levels of DA receptors and tyrosine hydroxylase. It was also not related to changes in plasma levels of testosterone. We suggest that increased aggressiveness may be a consequence of a significant decrease in serotonin (5-HT) and DA levels in the brain, decreasing fear and increasing anxiety in animals. The results also showed that effects of exposure to MF was more significant in the gills than in the liver of the Nile tilapia. A concentration-dependent decrease in both antioxidant enzyme activity and acetylcholinesterase activity in gills was observed, which may have made the animals more susceptible to

oxidative stress and CNS hyperstimulation, respectively. We also observed a possible metabolism of the drug due to the increase of the CbE activity in the gills of the animals, but not changes was observed in the biotransformation enzymes. The decrease in lipid peroxidation in the liver reinforces the absence of induction of the antioxidant system by the drug. However, with increasing global consumption of different classes of drugs and incomplete removal of these compounds by WWTP, our results emphasize the importance of studies that assess the risks that drugs in environmentally realistic concentrations can cause in non-target organisms, as well as the importance of better efficiency in the removal of drugs by conventional effluent treatment processes.

Keywords: pharmaceuticals, biomarkers, neurotransmitters, aggressiveness, Nile tilapia,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A) Mistura rancêmica do par d,l-treo-metilfenidato; (B) Isômeros d- e l-treo metilfenidato	22
Figura 2. Metabolização do MF em ácido ritalínico, pela enzima carboxilesterase	23
Figura 3. Neurotransmissão dopaminérgica, incluindo o terminal pré e pós-sináptico	25
Figura 4. Síntese da serotonina	27
Figura 5. Esquema simplificado das fases I e II da biotransformação e fase III de excreção....	28
Figura 6. Esquema simplificado da produção de ERO no metabolismo de detoxificação em situação de estresse oxidativo e peroxidação lipídica	30
Figura 7. <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo)	32

Capítulo 1

Figure 1. Total frequency of displays and attacks of <i>O. niloticus</i> males exposed to 0 (control), 20 (M20), and 100 (M100) ng.L ⁻¹ of methylphenidate for 5 days.....	59
Figure 2. Level of dopamine (A) and serotonin (B) in the brain, and plasma concentration of testosterone (C) of <i>O. niloticus</i> males exposed to 0 (control), 20 (M20), and 100 (M100) ng.L ⁻¹ of methylphenidate for 5 days.	60
Figure 3. Transcript levels of genes of dopamine receptor 1 (A), dopamine receptor 2 (B), dopamine receptor 5 (C), dopamine transporter (D), tyrosine hydroxylase (E), carboxylesterase 2 (F), carboxylesterase 3 (G) and enzymatic activity of carboxylesterase (H) of <i>O. niloticus</i> exposed to 0 (control), 20 (M20) and 100 (M100) ng.L ⁻¹ of methylphenidate for 5 days.....	61

Capítulo 2

Figura 1: Atividade das enzimas antioxidantes (A) catalase (CAT) e (B) glutathione peroxidase (GPx) em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L ⁻¹), por 5 dias.	71
Figura 2: Atividade das enzimas de biotransformação (A) 7-etoxioresorufina O-deetilase (EROD) e (B) 7-benzilóxioresorufina O-desalquilase (BROD) em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L ⁻¹), por 5 dias.....	72
Figura 3: Atividade das enzimas (A) acetilcolinesterase (AChE) e (B) carboxilesterase (CbE) em fígado e brânquias de <i>O. niloticus</i> expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L ⁻¹), por 5 dias.	73

Figura 4: Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em fígado e brânquias de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L⁻¹), por 5 dias.....74

LISTA DE TABELAS

Table 1: Selected genes and their predicted molecular functions and primer sequences.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
ALDH	Aldeído desidrogenase
BROD	7-benzilóxioresorufina <i>O</i> -desalquilase
CbE	Caroxilesterase
DA	3,4-dihidroxi-feniletanamina
DAT	Transportador de dopamina
EROD	etoxioresorufina- <i>O</i> -deetilase
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
5-HT	5-hidroxitriptamina
MF	Metilfenidato
NE	Norepirefrina
T	Testosterona
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TH	Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Fármacos no ambiente aquático</i>	19
1.2 Metilfenidato	21
1.3 <i>Dopamina e serotonina</i>	23
1.4 <i>Biomarcadores de poluição ambiental</i>	27
1.5 <i>A tilápia como organismo teste</i>	31
2. OBJETIVO	35
2.1 <i>Objetivo geral</i>	35
2.2 <i>Objetivo específico</i>	35
3. METODOLOGIA E RESULTADOS	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO GERAL	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Fármacos no ambiente aquático*

Toneladas de produtos farmacêuticos são utilizadas por ano para prevenir doenças e recuperar a saúde do homem e de animais (BOUND; KITSOU; VOULVOULIS, 2006; CALISTO; ESTEVES, 2009; GROS; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2006; JONES; VOULVOULIS; LESTER, 2004). Segundo a empresa americana QuintilesIMS (2015), o uso de produtos farmacêuticos alcançará globalmente 4500 bilhões de doses em 2020, aproximadamente 24% a mais que em 2015, sendo que o Brasil, juntamente com a China, Índia, Rússia e Indonésia, está entre os mercados que se espera ter um maior uso de medicamentos nos próximos anos (MEZZELANI; GORBI; REGOLI, 2018). Uma consequência inevitável desse aumento no consumo de produtos farmacêuticos é uma maior descarga no meio ambiente (CORCORAN et al., 2010).

Os problemas ambientais decorrentes do aumento do consumo de fármacos é uma questão que começou a ser avaliada entre os anos de 1960 e 1970 nos Estados Unidos, quando o ácido clofíbrico, o ácido salicílico e seus metabólitos foram detectados em efluentes tratados (HIGNITE; AZARNOFF, 1977). Com isso, começaram a ser publicados os primeiros relatórios referentes à remoção incompleta de alguns produtos farmacêuticos por estações de tratamento de águas residuais (ETAR). As ETAR foram projetadas para remover sólidos suspensos e cargas orgânicas, e sua eficácia na remoção de micropoluentes, como fármacos, pode, em alguns casos, ser insignificante (LOLIĆ et al., 2015; PETROVIC et al., 2002).

Após a ação terapêutica, os fármacos muitas vezes são excretados via urina e fezes na sua forma inalterada ou como metabólito ativo, e posteriormente descartados em águas residuais, e a remoção incompleta faz com que haja uma descarga contínua desses produtos no ambiente (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; LETZEL et al., 2010). Embora muitos fármacos sejam projetados para modular a fisiologia e o comportamento em humanos, outros

organismos, como os aquáticos, podem também sofrer alterações fisiológicas e comportamentais quando expostos a esses compostos, o que aumenta a preocupação em relação aos impactos causados por fármacos em espécies aquáticas que vivem perto de emissários de águas residuais (ARNOLD et al., 2013; BOXALL, 2004; CORCORAN et al., 2010).

As águas residuais urbanas são geralmente a maior fonte de fármacos no ambiente (ANDREU et al., 2016). Porém, esgotos sanitários e hospitalares (BROWN, 2004; KÜMMERER, 2001; LE CORRE et al., 2012; NEDELEC; ROSENGREN, 2002) resíduos industriais, instalações veterinárias (BOXALL, 2004; CAVENATI et al., 2012), disposição domiciliar incorreta ((BOUND; KITSOU; VOULVOULIS, 2006; RUHOY; DAUGHTON, 2008) e lixiviação de deposições terrestres (por exemplo, sólido aterros sanitários) (CORCORAN et al., 2010), são outras fontes que devem ser consideradas e não subestimadas (MANKES; SILVER, 2013).

Estudos mostram que os fármacos podem estar presentes em águas superficiais em baixas concentrações, de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ANDREU et al., 2016; CHEN et al., 2011; FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). No entanto, mesmo que detectados em concentrações relativamente baixas, podem ser persistentes e capazes de atingirem organismos não-alvo gerando efeitos significativos a longo prazo (AGUIRRE-MARTÍNEZ et al., 2015; BOXALL, 2004; HALLING-SØRENSEN et al., 1998), uma vez que os fármacos são produtos lipofílicos, bioacumulativos e têm baixa pressão de vapor, facilitando a sua dispersão no meio ambiente (TORRES et al., 2012). É importante ressaltar que a contaminação por fármacos, depende não apenas das características da molécula em questão, mas também das instalações da ETAR, assim como de outros fatores ambientais (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; SOLÉ et al., 2006).

A literatura nos mostra que representantes de diferentes classes de fármacos, podem ser encontrados em diferentes compartimentos aquáticos pelo mundo todo. Andreu e colaboradores

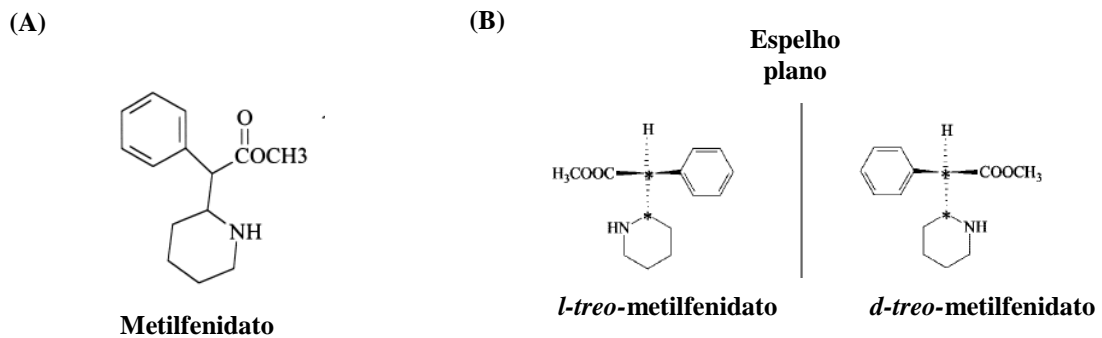
(2016), detectaram 33 amostras de uma lagoa e de canais de irrigação da Espanha, contaminadas por pelo menos um de 17 fármacos encontrados na região e analisados, sendo que o ibuprofeno e a codeína foram os mais frequentemente detectados. Matamoros e colaboradores (2012) também constataram a presença de 17 fármacos em dois rios no norte da Dinamarca, entre eles diclofenaco e cafeína. A presença de analgésicos também foi detectada em águas marinhas do norte de Portugal (LOLIĆ et al., 2015). O anti-hipertensivo losartana, foi detectado em 100% das amostras analisadas na Baía de Santos, São Paulo-Brasil (CORTEZ et al., 2018).

Dentre essas classes de fármacos, drogas psiquiátricas também têm sido detectadas em efluentes de águas residuais e na superfície da água (CALISTO; ESTEVES, 2009; FICK et al., 2017; KLAMINDER et al., 2015; METCALFE et al., 2010; SCHULTZ; FURLONG, 2008; VERLICCHI; AL AUKIDY; ZAMBELLO, 2012). Sabe-se que muitos desses produtos farmacêuticos psiquiátricos podem bioconcentrar em tecidos de peixes, especialmente no cérebro (BROOKS et al., 2003), mas também no plasma, fígado e tecido muscular dos animais (HEYNEN, 2016; SCHULTZ; FURLONG, 2008), afetando múltiplos processos biológicos, incluindo reprodução, crescimento, metabolismo, imunidade, alimentação, locomoção, fisiologia e comportamento do animal (FONG; FORD, 2014).

1.2 Metilfenidato

O metilfenidato (metil 2-fenil-2-(2-piperidil) acetato), princípio ativo do medicamento Ritalina[®], é um estimulante do SNC prescrito para crianças e adolescentes diagnosticados com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (KIMKO; CROSS; ABERNETHY, 1999; TEO et al., 2003). Esse composto é formado por quatro isômeros, um par *d,l-eritro*-metilfenidato e um par *d,l-treo*-metilfenidato. No entanto, somente a mistura racêmica do par de enantiômeros *d,l-treo*-metilfenidato é usada terapêuticamente por causar menos efeitos colaterais no paciente (MARKOWITZ et al., 2006; PATRICK et al., 1987).

Figura 1 - (A) Mistura rancêmica do par *d,l-treo*-metilfenidato (MARKOWITZ, 2003); (B) Isômeros *d*- e *l-treo*-metilfenidato; * representação do carbono assimétrico (SUN et al.,2004)



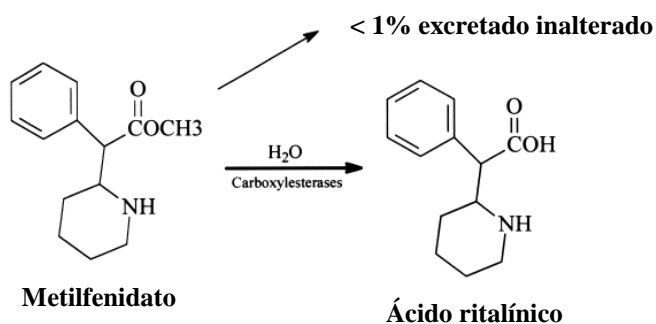
O efeito terapêutico do MF no tratamento de TDAH está envolvido principalmente no aumento do nível de dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina; DA) extracelular no cérebro (CASTELLANOS et al., 1996; VOLKOW et al., 1995). Essa ação ocorre por que o MF se liga aos transportadores de recaptção da dopamina (DAT), bloqueando a volta da DA para a célula pré-sináptica (GATLEY et al., 1996; VOLZ et al., 2008). A ação principal do MF é no DAT, porém, esse fármaco pode atuar nos transportadores da norepinefrina [(R)-2-amino-1-3,4-hydroxyethyl; NE) e da serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), embora em menor intensidade (GAMO; WANG; ARNSTEN, 2010; SOLANTO, 2002).

Disfunção nos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, que possuem funções autorreguladoras comportamentais, como atenção seletiva e motivação, estão implicados na patogênese de TDAH (SOLANTO, 2002). No entanto, o aumento do nível desses neurotransmissores no meio extracelular pelo MF, melhora o estado de alerta comportamental do organismo, que passa a ter um aumento da atividade cerebral, ocasionando melhoras na concentração e coordenação motora (HABIBZADEH et al., 2011).

A via metabólica predominante no processo de biotransformação do MF é a desesterificação para formar o metabólito ácido ritalínico, farmacologicamente inativo (PATRICK et al., 1987). Esse processo de biotransformação, em humanos, ocorre principalmente no fígado por ação da enzima carboxilesterase CES1A1 (Fig. 2) (PATRICK et al., 1987; SUN et al., 2004). As carboxilesterases hepáticas humanas desempenham um papel

importante no metabolismo e na desintoxicação de drogas com éster na composição (HOSOKAWA et al., 2008; SATOH; HOSOKAWA, 1995).

Figura 2: Metabolização do MF em ácido ritalínico, pela enzima carboxilesterase (MARKOWITZ et al., 2003)



Em mamíferos, a absorção de metilfenidato é essencialmente rápida, e o fármaco atinge um pico de 1 a 2 horas após a administração oral, bloqueando mais de 50% dos transportadores de dopamina (MODI et al., 2000; SWANSON; VOLKOW, 2002; WARGIN et al., 1983). A excreção pode ocorrer via urinária ou fecal, sendo que apenas 1% do fármaco excretado é inalterado (MARKOWITZ et al., 2006). Neste sentido, Letzel e colaboradores (2010), demonstraram que o tratamento biológico de águas residuais não é suficiente para eliminar ácido ritalínico excretado, uma vez que esse metabólito foi encontrado em efluentes de águas residuais da Alemanha na faixa de 50-170 ng.L⁻¹, colocando em risco os organismos não-alvos presentes no ecossistema. Baseando-se na potencial contaminação dos ambientes aquáticos pelo MF e sabendo que este fármaco atua no sistema dopaminérgico humano, faz-se necessário, avaliar os potenciais efeitos deste fármaco em animais aquáticos, especialmente no sistema dopaminérgico desses animais, tais como os peixes.

1.3 Dopamina e serotonina

Sabe-se que os neurotransmissores são mensageiros químicos que iniciam, amplificam e modulam os sinais entre os neurônios e outras células do corpo (RICO et al., 2011). Estudos em peixes mostram que qualquer alteração na síntese e funcionamento dos neurotransmissores,

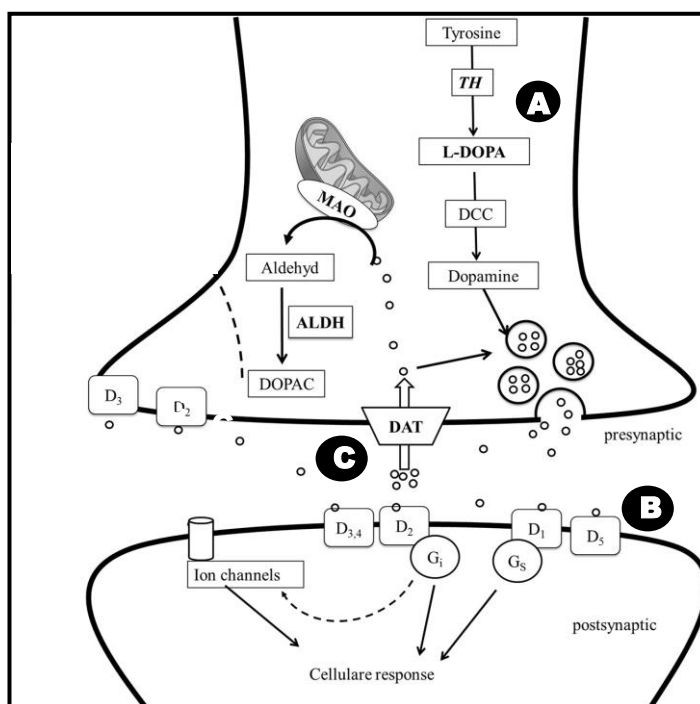
causadas por exposição a agentes estressores, podem resultar em alterações comportamentais nos peixes (BOSCOLO et al., 2018a; DE SERRANO; FONG; RODD, 2016; LEVIN et al., 2011). O comportamento é o resultado das interações de um organismo com seu ambiente externo, integrando processos fisiológicos, bioquímicos, metabólicos e neurológicos com fatores ambientais (GRUE, et al, 2002). A DA e a 5-HT, são neurotransmissores importantes associados com uma ampla gama de efeitos fisiológicos no SNC (DAUBERT; CONDRON, 2010) e modulam os efeitos comportamentais em todas as classes de vertebrados.

O sistema dopaminérgico é responsável pela locomoção, cognição, emoção (GOLDMAN-RAKIC, 1998; SCHULTZ; FURLONG, 2008) e está envolvido também na ativação comportamental, no comportamento motivado e no processamento de recompensas (IKEMOTO; PANKSEPP, 1999). Portanto, qualquer alteração nesses neurotransmissores devido à exposição a poluentes poderia implicar em alterações no comportamento agressivo em peixes (DE BOECK et al., 1995; SMITH et al., 1995). Por outro lado, o sistema serotonina regula percepção, ansiedade, comportamento sexual, apetite, função, dor (LUCKI, 1998; PARSEY, 2010) e está associado com a inibição da agressão (VOLAVKA, 1999). A disfunção serotoninérgica tem sido confiavelmente associada a comportamentos agressivos em animais (COCCARO et al., 1989; MICZEK; FISH; BOLD, 2002; RALEIGH et al., 1991).

O precursor da síntese de DA é o aminoácido tirosina, que é convertido pela enzima tirosina hidroxilase (TH) em L-DOPA (l -3,4- diidroxifenilalanina). Em seguida, a enzima aminoácido aromático descarboxilase (DCC), converte L-DOPA em DA, que é transportada para o interior de vesículas secretoras para armazenamento e liberação (STANDAERT; GALANTER, 2009) (Fig. 3A). Uma vez liberados na fenda sináptica, a DA ativa receptores pós-sinápticos para poder realizar a neurotransmissão (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Os receptores de dopamina são membros da família de proteínas receptoras acopladas à proteína G, e são divididos em duas classes: a classe D1, formada por dois receptores (D1 e D5) e a classe D2,

formada por três receptores (D2, D3 e D4) (CALLIER et al., 2003; NÜRNBERGER et al., 2004; SURMEIER et al., 2007). O receptor D2 está localizado na membrana pré-sináptica e é responsável por controlar a quantidade de DA liberada (Fig. 3B).

Figura 3 - Neurotransmissão dopaminérgica, incluindo o terminal pré e pós-sináptico. Abreviações: ALDH: aldeído desidrogenase; COMT: catecolamina-O-metiltransferase; DDC: descarboxilase; DOPAC: ácido diidroxifenilacético; DAT: transportador de dopamina; MAO: monoamina oxigenase; TH: tirosina hidroxilase (BARTL et al. (2017) com algumas modificações)



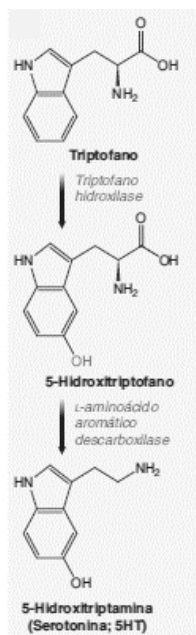
O DAT é uma proteína de membrana plasmática que funciona para transportar o DA extracelular de volta para o citoplasma das células pré-sinápticas (WAYMENT et al., 2008) (Fig 3C). A principal atuação do MF está relacionada com a inibição do DAT, causando um aumento nos níveis dessa monoamina na fenda sináptica (CHALLMAN; LIPSKY, 2000; EASTON et al., 2007; ROESSNER et al., 2010). Por sua vez, o nível elevado de DA extracelular ativa os receptores pré-sinápticos D2, que reduzem a liberação da DA durante o impulso nervoso. Como consequência, a ativação do receptor D2 pode diminuir a síntese da enzima TH, e desse modo, diminuir a síntese de DA.

Quando a DA volta para o citoplasma da célula pré-sináptica, pode retornar às vesículas através do transportador monoamínico vesicular (VMAT) para uso subsequente na

neurotransmissão, ou ainda, pode ser degradada pela ação das enzimas monoamina oxidase (MAO) ou catecol-O-etil transferase (COMT) (STANDAERT; GALANTER, 2009). Ou ainda, a DA pode ser metabolizada em ácido diidroxifenilacético (DOPAC) pela ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (BARTL et al., 2017). Quansah e colaboradores (2017) mostraram recentemente que em roedores Sprague-Dawley o tratamento agudo com MF (2,0 mg. Kg⁻¹) diminuiu a densidade da VMAT2, enquanto o tratamento crônico aumentou. Esse estudo sugere que os níveis aumentados de VMAT2, pode, alternativamente, estar associado ao aumento do armazenamento da NE, uma vez que já se sabe que a DA é convertida em NE pela enzima dopamina β-hidroxilase (GLASER et al., 2006). Além disso, observaram que o tratamento crônico MF, melhorou significativamente a rotatividade do DOPAC no cerebelo.

A serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), pertencente ao grupo das monoaminas neurotransmissoras, juntamente com as catecolaminas (OLIVIER; VAN OORSCHOT, 2005). Esse neurotransmissor é sintetizado a partir do aminoácido triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), que converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano. A seguir, a L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano em serotonina ((NADAL-VICENS; CHYUNG, 2009).

Figura 4: Síntese da serotonina (5-HT) (NADAL-VICENS et al., 2009)



1.4 Biomarcadores de poluição ambiental

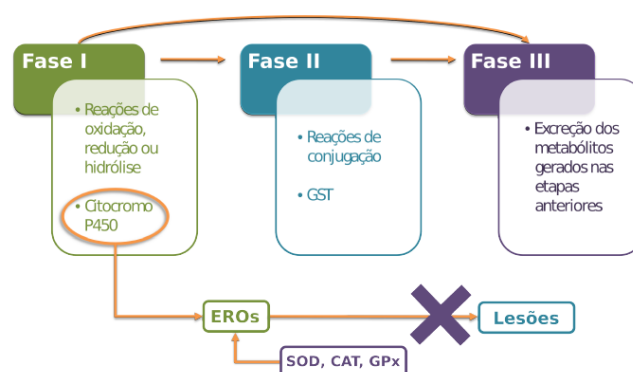
O uso de biomarcadores em estudos de monitoramento tem sido uma ferramenta que possibilita a determinação de efeitos adversos causados em organismos aquáticos expostos a concentrações subletais de diferentes tipos de contaminantes (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dentre esses biomarcadores, os bioquímicos, que analisam as alterações nos sistemas enzimáticos dos organismos, têm sido bastante empregados em estudos de biomonitoramento ambiental.

Sabe-se que os fármacos passam por um processo de metabolização por enzimas específicas, e são biotransformados em compostos mais facilmente excretados pela célula (JAKOBY e ZIEGLER, 1990). O grau de metabolização que ocorre pode variar muito entre os compostos; alguns são completamente metabolizados, enquanto outros compostos não são metabolizados e são excretados como o composto em sua forma original (CORCORAN et al., 2010). A biotransformação dos compostos químicos é dividida em duas fases: fase I (reações de oxidação, redução ou hidrólise) e a fase II (reações de conjugação) (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

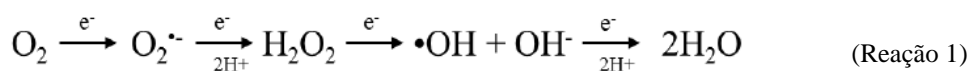
As reações de fase I são catalisadas por uma família de enzimas monoxigenases microsossomais, como o citocromo P450 (CYPs), que atuam transformando o composto químico original lipofílico em produtos mais solúveis em água, facilitando a excreção dos produtos de degradação (Bucheli e Fent, 1995). Essa família de CYPs apresenta uma grande variedade de isoformas nos organismos vivos. A isoforma CYP1A é um dos biomarcadores mais utilizados para os processos ambientais, sendo a etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) comumente avaliada como indicativo da atividade dessa isoforma do citocromo P450 (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Outra isoforma do P450 utilizada na avaliação da contaminação ambiental é a 7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase (BROD). Enzimas do citocromo P450 são importantes no metabolismo de um grande número de drogas terapêuticas (RENTON, 2004). Estudo com machos roedores Swiss Webster, mostrou que esses animais ao receberem 5 e 10mg/dia/kg de MF durante 14 dias, tiveram uma inibição de até 50% da atividade catalítica e dos níveis proteicos de CYP450 em células hepáticas (NEDELEC; ROSENGREN, 2002).

A fase II da biotransformação envolve a adição de um ligante endógeno, geralmente um grupo polar ao composto químico parental ou a seus metabólitos, para facilitar sua excreção (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Como exemplo de enzimas da fase II temos a glutaciona tranferase (GST), que catalisam as reações adicionando a glutaciona reduzida (GSH) ao composto original ou metabólito resultante da fase I, originando um conjugado de glutaciona que será excretado em uma terceira fase (fase III) (Fig. 5).

Figura 5 - Esquema simplificado das fases I e II da biotransformação e fase III de excreção. (NOGUEIRA et al., 2013)



Durante o processo de biotransformação dos fármacos, pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que correspondem aos produtos da redução do oxigênio molecular (O_2), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação 1) (STEGEMAN, 1993), que também são constantemente produzidas no organismo durante o processo de respiração celular (NORDBERG; ARNÉR, 2001). No entanto, quando presentes em excesso no organismo, as EROs podem causar danos as biomoléculas levando à inativação enzimática, oxidação das bases do DNA, degradação de proteínas e peroxidação lipídica (LIVINGSTONE, 2001), gerando um quadro de estresse oxidativo no organismo.

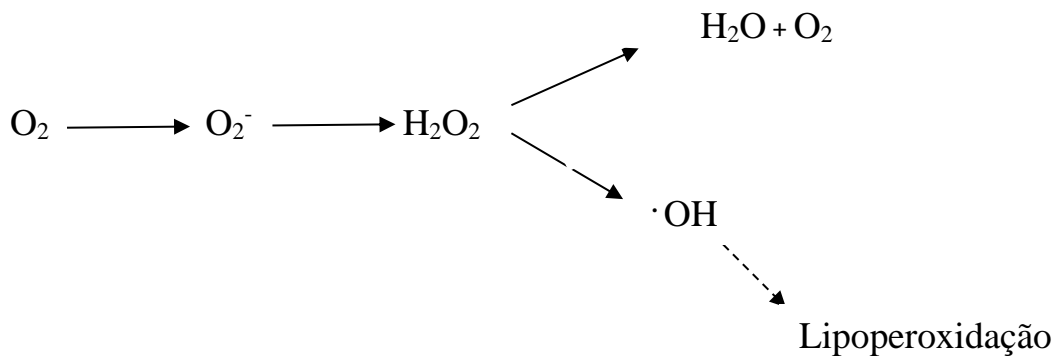


As células possuem um sistema de defesa antioxidante, enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam para combater as ERO e minimizar os danos oxidativos causado por esses produtos (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998). O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de ERO excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, levando à um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA et al., 2005; SAKURAGUI et al., 2013). As enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), são enzimas específicas que catalisam reações que transformam as EROs em moléculas não reativas, contribuindo no controle do estresse oxidativo (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As CATs são enzimas que facilitam a remoção do H_2O_2 , que é metabolizado em O_2 e água. Por outro lado, a GPx além de catalisar a redução de H_2O_2 , reduz também os peróxidos lipídicos (ROOH). Uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes pode indicar que a capacidade antioxidante foi suprimida, favorecendo a ocorrência de processos oxidativos, como a peroxidação lipídica (LU; YANG; LI, 2013). A peroxidação lipídica é um processo no qual

as membranas celulares são oxidadas pelas ERO, levando a formação de produtos secundários como o malondialdeído (MDA), que é amplamente usado como indicador de injúrias causadas por estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2005; OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) (Fig. 6).

Figura 6 - Esquema simplificado da produção de ERO no metabolismo de detoxificação em situação de estresse oxidativo e peroxidação lipídica.



A inibição de B-esterases, tais como carboxilesterases (CbE) e principalmente a acetilcolinesterase (AChE), também tem sido utilizada como indicativo da presença de fármacos no ambiente (FONTES et al., 2017; LIONETTO et al., 2013). A enzima AChE é predominante entre todas as formas colinesterásicas existentes nas espécies de vertebrados (NUNES, 2010). Essa enzima hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh) a acetato e colina nas sinapses colinérgicas, durante o impulso nervoso (BAINY et al., 2006; LIMA; ROQUE; ALMEIDA, 2013). Desta maneira, quando a AChE é inibida ocorre um acúmulo de ACh na fenda sináptica causando hiperestimulação dos receptores de ACh que altera a contração muscular normal (VIOQUE-FERNÁNDEZ; ALVES DE ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2009) resultando em efeitos neurotóxicos deletérios nos organismos, podendo causar a morte do mesmo (PEAKALL, 1992). Porém, o papel fisiológico atribuído à AChE não se limita apenas à regulação de neurotransmissão, e pode afetar também os processos diferenciação neural (GREENE; RUKENSTEIN, 1981).

As CbE, tanto em vertebrados como em humanos, estão envolvidos no metabolismo de fármacos, especialmente, aqueles administrados em uma forma de éster (REDINBO; POTTER, 2005; POTTER; WADKINS, 2006), e têm sido consideradas um biomarcador de efeitos neurotóxicos nos organismos. As CbE são uma família de isoenzimas (CES1, CES2, CES3) (SATO; HOSOKAWA, 1995), que catalisam a hidrólise de ácidos graxos provenientes de compostos químicos, via adição de uma molécula de água (MYERS et al. 1988). Em humanos, sabe-se que o MF é metabolizado no fígado pela CES1A, porém, não há estudos que confirmem a participação dessa enzima na metabolização desse fármaco em peixes, o que faz dessas análises importantes biomarcadores para identificar efeitos deletérios causados pela contaminação por fármacos.

Além das análises enzimáticas, variações moleculares também são rotineiramente utilizadas como biomarcadores na avaliação do impacto de poluentes ambientais (NIKINMAA; RYTKÖNEN, 2011; REGOLI; GIULIANI, 2014). Mecanismos que regulam a síntese, processamento, transporte, tradução e estabilidade de RNAm são pontos críticos na função celular (MAIER; GÜELL; SERRANO, 2009). No entanto, todas as etapas da via de expressão gênica podem ser reguladas pelas condições ambientais e pela exposição a contaminantes ambientais (NIKINMAA; RYTKÖNEN, 2011). Por exemplo, EROs, como H₂O₂, são conhecidas por interferir na síntese de RNAm de CYPs (RISSO-DE FAVERNEY et al., 2000), prejudicando os processos de biotransformação da célula e tornando o indivíduo mais suscetível aos efeitos negativos da intoxicação. Por outro lado, essa interferência pode ocorrer também à nível pós-transcricional pelo aumento da degradação do RNAm,

1.5 A tilápia como organismo teste

Organismos aquáticos como peixes, são capazes de bioacumular poluentes direta ou indiretamente devido, principalmente, a ingestão de contaminantes lançados em corpos

aquáticos (MATSUMOTO et al., 2006). A tilápia-do-Nilo (Figura 7) (Linneaus, 1758), é uma das espécies tropicais e subtropicais mais importantes economicamente, de manejo fácil e grande sensibilidade frente a poluentes ambientais, o que a tornou um modelo biológico muito utilizado em diversos estudos para determinar a toxicidade de substâncias presentes nos ambientes aquáticos (BOSCOLO PEREIRA et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2011; TRÍDICO et al., 2010). As tilápias apresentam padrões de comportamentos sociais e estabelecem hierarquia de dominância e subordinação dentro do território habitado pelo grupo (GOLDSTEIN et al., 1988), portanto, são consideradas modelos excelentes para explorar os efeitos dos contaminantes ambientais no comportamento agressivo dos peixes (BARRETO; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015; BOSCOLO et al., 2018b; BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011).

Figura 7 - *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)



A história comportamental das interações agressivas é um fator preponderante na determinação resposta ao estresse socialmente mediada na tilápia do Nilo (ALVARENGA; VOLPATO, 1995). Estudos indicam que neurotransmissores, como a DA influenciam a agressividade por meio da modulação da atividade da 5-HT, o neurotransmissor chave do comportamento agressivo em peixes (BOSCOLO et al., 2018b; DE ALMEIDA et al., 2005; NELSON; CHIAVEGATTO, 2001). Esta inter-relação pode ser afetada pela presença de poluentes ambientais que atuam no sistema dopaminérgico e serotoninérgico, como o MF que afeta as interações agressivas entre os peixes.

O ensaio de agressão por espelho é um método rápido para avaliar comportamentos agressivos em peixes (ELWOOD et al., 2014; MCCALLUM et al., 2017). Ainda, pode-se dizer que no contexto da pesquisa de personalidade, o uso de espelhos para avaliar a agressividade é ainda uma técnica com mérito, particularmente, porque evita a necessidade de enfrentar um adversário real, conseqüentemente, evita problemas de bem-estar que surgem entre dois animais colocados juntos, onde um pode prejudicar a saúde do outro (ELWOOD et al., 2014).

CONCLUSÃO GERAL

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO GERAL

O metilfenidato em concentrações ambientalmente realística:

- Aumentou a agressividade nos animais. Porém, diferentemente do esperado, o aumento da agressividade parece estar relacionado a uma diminuição dos níveis de 5HT. Esse efeito não se refletiu nos níveis de DA e no nível de transcrito do transportador, dos receptores de DA e da enzima TH.
- Não causou estresse oxidativo nos peixes, uma vez que não alterou o sistema de enzimas antioxidantes, e não ocasionou níveis aumentados de peroxidação lipídica.
- Provocou uma diminuição da atividade da AChE na brânquia, que pode ter causado uma hiperestimulação do SNC, que por sua vez, pode ter contribuído com o aumento da agressividade dos animais. Entretanto, a atividade da AChE não foi medida no encéfalo.
- Além disso, um aumento da atividade da CbE na brânquia sugere que o essa enzima esteja atuando na metabolização desse fármaco em tilápias do Nilo

Desta maneira, nossos resultados reforçam a importância de estudos que avaliem os riscos que os fármacos, em concentrações ambientalmente realísticas, podem causar em organismos não alvo, assim como, a importância de uma melhor eficiência na remoção dos fármacos pelos processos convencionais de tratamento dos efluentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V. et al. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. **Chemosphere**, v. 120, p. 75–85, 1 fev. 2015.
- ALCAZAR, R. M. et al. Two types of dominant male cichlid fish: behavioral and hormonal characteristics. 2016.
- ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, n. 1, p. 21–30, 2005.
- ALVARENGA, C. M. D.; VOLPATO, G. L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology & Behavior**, v. 57, n. 1, p. 75–80, 1 jan. 1995.
- AMARA, S. G.; KUHAR, M. J. Neurotransmitter Transporters: Recent Progress. **Annual Review of Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 73–93, 28 mar. 1993.
- AMEUR, W. BEN et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, v. 135, p. 67–74, set. 2015.
- AMODEO, L. R. et al. Acute and long-term effects of adolescent methylphenidate on decision-making and dopamine receptor mRNA expression in the orbitofrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 324, p. 100–108, 2017.
- ANDREAZZA, A. C. et al. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1282–1288, 2007.
- ANDREU, V. et al. Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 5, p. 1329–1339, 10 jul. 2009.
- ANDREU, V. et al. Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 278–286, 2016.
- ANDREWS, G. D.; LAVIN, A. Methylphenidate Increases Cortical Excitability via Activation of Alpha-2 Noradrenergic Receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 3, p. 594–601, 6 mar. 2006.
- ARANTES, A. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. December 2017, p. 248–256, 2018.
- ARNOLD, K. E. et al. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. **Biology letters**, v. 9, n. 4, p. 20130492, 23 ago. 2013.
- BARRETO, R. E. et al. Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 42, n. 2, p. 109–118, 2009.
- BARRETO, T. N.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Homogeneously sized groups increase aggressive interaction and affect social stress in Thai strain Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 48, n. 5, p. 309–318, 2015.
- BARTL, J. et al. Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry The impact of methylphenidate and its enantiomers on dopamine synthesis and metabolism in vitro. v. 79, n. July, p. 281–288, 2017.
- BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.
- BETHANCOURT, J. A.; CAMARENA, Z. Z.; BRITTON, G. B. Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 1, p. 50–57, 24 ago. 2009.
- BISESI, J. H.; BRIDGES, W.; KLAINÉ, S. J. Reprint of: Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 88–96, 2014.
- BOCCHIO, M. et al. Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. **Frontiers in neural circuits**, v. 10, p. 24, 2016.
- BOSCOLO, C. N. P. et al. Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 191, p. 832–838, 2018a.
- BOSCOLO, C. N. P. et al. Chemosphere Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). v. 191, p. 832–838, 2018b.
- BOSCOLO, C. N. P.; MORAIS, R. N.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 1–2, p. 154–159, 2011.
- BOSCOLO PEREIRA, T. S. et al. Estrogenic activities of diuron metabolites in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 146, p. 497–502, 2016.
- BOUND, J. P.; KITSOU, K.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 301–307, 1 maio 2006.
- BOXALL, A. B. A. The environmental side effects. **EMBO reports**, v. 5, p. 1110–1116, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.
- BROOKS, B. W. et al. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 3, p. 169–183, 2003.
- BROWN, E. S.; VARGHESE, F. P.; MCEWEN, B. S. Association of depression with medical

- illness: Does cortisol play a role? **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 1, p. 1–9, 2004.
- BROWN, J. H. Jeremiah Jenks: A Pioneer of Industrial Organization? **Journal of the History of Economic Thought**, v. 26, n. 01, p. 69, 11 mar. 2004.
- BUNCH, A. R.; BERNOT, M. J. Distribution of nonprescription pharmaceuticals in central Indiana streams and effects on sediment microbial activity. p. 97–109, 2011.
- BURGARD, D. A. et al. Potential trends in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) drug use on a college campus: Wastewater analysis of amphetamine and ritalinic acid. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 242–249, 2013.
- CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1257–1274, 2009.
- CALLIER, S. et al. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 7, p. 489–502, 1 out. 2003.
- CARDWELL, J. R.; LILEY, N. R. Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). **Hormones and Behavior**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 1 mar. 1991.
- CASTELLANOS, F. X. et al. Cerebrospinal Fluid Homovanillic Acid Predicts Behavioral Response to Stimulants in 45 Boys with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 125–137, fev. 1996.
- CAVENATI, S. et al. Simultaneous determination of several veterinary pharmaceuticals in effluents from urban, livestock and slaughterhouse wastewater treatment plants using a simple chromatographic method. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 3, p. 603–611, ago. 2012.
- CELSO, A. et al. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. v. 19, n. 1, p. 35–39, 2006.
- CHALLMAN, T. D.; LIPSKY, J. J. Methylphenidate: Its Pharmacology and Uses. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, n. 7, p. 711–721, 1 jul. 2000.
- CHEN, F. et al. Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p. 1490–1498, 1 jun. 2011.
- CM, C. et al. Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. n. 2, 2014.
- COCCARO, E. F. et al. Serotonergic Studies in Patients With Affective and Personality Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 46, n. 7, p. 587, 1 jul. 1989.
- CORCORAN, J. et al. Pharmaceuticals in the aquatic environment : A critical review of the evidence for health effects in fish. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 3, p. 844–854, 2010.
- CORTEZ, F. S. et al. Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 637–638, p. 1363–1371, 2018.
- DAUBERT, E. A.; CONDRON, B. G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and

circuitry. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 9, p. 424–434, set. 2010.

DAVIS, M. D.; HEFFNER, T. G.; COOKE, L. W. Dopamine Agonist-Induced Inhibition of Neurotransmitter Release from the Awake Squirrel Monkey Putamen as Measured by Microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 2, p. 659–666, 1997.

DE ALMEIDA, R. M. M. et al. Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, n. 1–3, p. 51–64, 2005.

DE BOECK, G. et al. Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. **Aquatic Toxicology**, v. 33, n. 3–4, p. 265–277, 1 out. 1995.

DE LIMA, D.; ROQUE, G. M.; DE ALMEIDA, E. A. Invitro and invivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 45–51, 2013.

DE SERRANO, A. R.; FONG, C.; RODD, F. H. Effects of methylphenidate on responses to novelty in a teleost fish (*Poecilia reticulata*). **Behavioural Brain Research**, v. 302, p. 53–59, 2016.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305–315, 2 jul. 1991.

DOMMETT, E. J. et al. Methylphenidate amplifies long-term plasticity in the hippocampus via noradrenergic mechanisms. **Learning & Memory**, v. 15, n. 8, p. 580–586, 6 ago. 2008.

DRESEL, S. H. et al. Simultaneous SPECT studies of pre- and postsynaptic dopamine binding sites in baboons. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 40, n. 4, p. 660–6, abr. 1999.

DUQUE-WILCKENS, N.; TRAINOR, B. C. **Behavioral Neuroendocrinology of Female Aggression**. [s.l.] Oxford University Press, 2017. v. 1

DZUL-CAAMAL, R. et al. The relationship between the bioactivation and detoxification of diazinon and chlorpyrifos, and the inhibition of acetylcholinesterase activity in *Chirostoma jordani* from three lakes with low to high organophosphate pesticides contamination. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 5, p. 779–790, 2014.

EASTON, N. et al. Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 405–414, 1 fev. 2007.

EGIDIO, G. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 266–270, 2014.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88–95, jul. 1961.

ELWOOD, R. W. et al. Do mirrors reflect reality in agonistic encounters? A test of mutual cooperation in displays. **Animal Behaviour**, v. 97, p. 63–67, 2014.

ENDRES, H. C. et al. First evidence that waterborne methylphenidate alters endocrine and

behavioral stress responses in zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 650, p. 114–117, 2017.

ENQUIST, M.; JAKOBSSON, S. Decision Making and Assessment in the Fighting Behaviour of *Nannacara anomala* (Cichlidae, Pisces). **Ethology**, v. 72, n. 2, p. 143–153, 26 abr. 2010.

ETCALFE, C. H. D. M. et al. ANTIDEPRESSANTS AND THEIR METABOLITES IN MUNICIPAL WASTEWATER , AND DOWNSTREAM EXPOSURE IN AN URBAN WATERSHED. v. 29, n. 1, p. 79–89, 2010.

FARAJ, B. A. et al. METABOLISM AND DISPOSITION OF METHYLPHENIDATE-14C: STUDIES IN MAN AND ANIMALS. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 191, n. 3, 1974.

FEDERICI, M. et al. Actions of methylphenidate on dopaminergic neurons of the ventral midbrain. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 361–365, 15 fev. 2005.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. v. 76, p. 122–159, 2006.

FICK, J. et al. Screening of benzodiazepines in thirty European rivers. **Chemosphere**, v. 176, p. 324–332, jun. 2017.

FONG, P. P.; FORD, A. T. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 4–13, 2014.

FONTES, M. K. et al. Accepted Manuscript. 2017.

GALLOWAY, T. S. et al. Rapid assessment of organophosphorous / carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. v. 61, p. 169–180, 2002.

GAMO, N. J.; WANG, M.; ARNSTEN, A. F. T. Methylphenidate and atomoxetine enhance prefrontal function through α 2-adrenergic and dopamine D1 receptors. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 10, p. 1011–1023, 2010.

GATLEY, S. J. et al. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. **Life sciences**, v. 58, n. 12, p. 231–9, 1996.

GENE, D. C. E. S. et al. Methylphenidate Side Effect Profile Is Influenced by Genetic Variation in the Attention-Deficit / Hyperactivity. v. 23, n. 10, p. 655–664, 2013.

GLASSMEYER, S. T. et al. Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, p. 5157–5169, jul. 2005.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. The cortical dopamine system: role in memory and cognition. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 42, p. 707–11, 1998.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Levels of Catechols in Epileptogenic and Nonepileptogenic Regions of the Human Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 50, n. 1, p. 225–229, 1 jan. 1988.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 678–690, 15 nov. 2006.

HABIBZADEH, A. et al. Illicit methylphenidate use among Iranian medical students: prevalence and knowledge. **Drug design, development and therapy**, v. 5, p. 71–6, 3 fev. 2011.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1 jan. 1998.

HENRY, T. B.; BLACK, M. C. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 2, p. 325–330, 2008.

HEYNEN, N. Urban political ecology II. **Progress in Human Geography**, v. 40, n. 6, p. 839–845, 10 dez. 2016.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, v. 20, n. 2, p. 337–341, jan. 1977.

HIRSCHENHAUSER, K.; OLIVEIRA, R. F. Social modulation of androgens in male vertebrates: meta-analyses of the challenge hypothesis. **Animal Behaviour**, v. 71, n. 2, p. 265–277, 1 fev. 2006.

HOSOKAWA, M. et al. Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 23, n. 10, p. 1022–7, out. 1995.

HOSOKAWA, M. et al. Structural Organization and Characterization of the Regulatory Element of the Human Carboxylesterase (CES1A1 and CES1A2) genes. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 1, p. 73–84, 1 jan. 2008.

HYSEK, C. M. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of methylphenidate and MDMA administered alone or in combination. p. 371–381, 2014.

IKEMOTO, S.; PANKSEPP, J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior : a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. p. 6–41, 1999.

IKEMOTO, S.; YANG, C.; TAN, A. Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. **Behavioural Brain Research**, v. 290, p. 17–31, 1 set. 2015.

JEMEC, A. et al. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in Daphnia magna toxicity test. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 144, n. 4, p. 303–309, 2007.

JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 335–350, 5 jan. 2004.

KIMKO, H. C.; CROSS, J. T.; ABERNETHY, D. R. Pharmacokinetics and Clinical Effectiveness of Methylphenidate. v. 37, n. 6, p. 457–470, 1999.

KISER, D. et al. The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 2, p. 786–798, 2012.

KLAMINDER, J. et al. Long-Term Persistence of an Anxiolytic Drug (Oxazepam) in a Large Freshwater Lake. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 17, p. 10406–10412, 18

set. 2015.

KOSTICH, M. S. et al. Predicting variability of aquatic concentrations of human pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4504–4510, 2010.

KRISTÓFERSDÓTTIR, D. D. The short-term effect of Methylphenidate on swim speed in zebrafish larvae. 2014.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. **Chemosphere**, v. 45, n. 6–7, p. 957–969, 1 nov. 2001.

LAVOIE, B.; SMITH, Y.; PARENT, A. Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 289, n. 1, p. 36–52, 1 nov. 1989.

LE CORRE, K. S. et al. Consumption-based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. **Environment International**, v. 45, p. 99–111, 15 set. 2012.

LETZEL, M. et al. Occurrence and fate of the human pharmaceutical metabolite ritalinic acid in the aquatic system. **Chemosphere**, v. 81, n. 11, p. 1416–1422, 2010a.

LETZEL, M. et al. Chemosphere Occurrence and fate of the human pharmaceutical metabolite ritalinic acid in the aquatic system. **Chemosphere**, v. 81, n. 11, p. 1416–1422, 2010b.

LEVAVI-SIVAN, B.; AIZEN, J.; AVITAN, A. Cloning , characterization and expression of the D 2 dopamine receptor from the tilapia pituitary. v. 236, p. 17–30, 2005.

LEVIN, E. D. et al. Persistent behavioral impairment caused by embryonic methylphenidate exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 668–673, 2011.

LI, S.; PELLETIER, G. Role of dopamine in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the male rat brain as studied by in situ hybridization. **Endocrinology**, v. 131, n. 1, p. 395–399, 1 jul. 1992.

LIMA, D. DE; ROQUE, G. M.; ALMEIDA, E. A. DE. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebra fi sh (*Danio rerio*). v. 91, 2013.

LIONETTO, M. G. et al. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine : New Insights and Future Perspectives. v. 2013, 2013.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. v. 42, n. 8, 2001.

LOLIĆ, A. et al. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 240–250, 2015.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation research**, v. 399, n. 1, p. 3–15, 13 mar. 1998.

LOWRY, C. A. et al. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress**, v. 8, n. 4, p. 233–246, 7 jan. 2005.

- LU, G.; YANG, X.; LI, Z. Contamination by metals and pharmaceuticals in northern Taihu Lake (China) and its relation to integrated biomarker response in fish. p. 50–59, 2013.
- LU, R. et al. The aldehyde dehydrogenase 2 polymorphisms on neuropsychological performance in bipolar II disorder with or without comorbid anxiety disorder. p. 1–14, 2018.
- LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 3, p. 151–162, ago. 1998.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.
- MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 583, n. 24, p. 3966–3973, 2009.
- MANKES, R. F.; SILVER, C. D. Science of the Total Environment Quantitative study of controlled substance bedside wasting , disposal and evaluation of potential ecologic effects ☆. v. 444, p. 298–310, 2013.
- MARKOWITZ, J. S. et al. Advances in the Pharmacotherapy of Attention-Deficit – Hyperactivity Disorder : Focus on Methylphenidate Formulations. p. 1–9, [s.d.].
- MARKOWITZ, J. S. et al. A Comprehensive *In Vitro* Screening of *d*-, *l*- , and *dl*-threo - Methylphenidate: An Exploratory Study. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 687–698, dez. 2006.
- MARTINS, M. R. et al. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. v. 8, p. 0–8, 2006.
- MATAMOROS, V. et al. Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland. **Chemosphere**, v. 88, n. 9, p. 1083–1089, 2012.
- MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.
- MCCALLUM, E. S. et al. Chemosphere An evaluation of behavioural endpoints : The pharmaceutical pollutant fl uoxetine decreases aggression across multiple contexts in round goby (*Neogobius melanostomus*). **Chemosphere**, v. 175, p. 401–410, 2017.
- METCALFE, C. D. et al. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 79–89, 1 jan. 2010.
- METZ, C. N.; TRACEY, K. J. It takes nerve to dampen inflammation. v. 6, n. 8, p. 2004–2005, 2005.
- MEZZELANI, M.; GORBI, S.; REGOLI, F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. **Marine Environmental Research**, n. May, p. 1–21, 2018.
- MICZEK, K. A.; FISH, E. W.; BOLD, J. F. DE. Social and neural determinants of aggressive behavior : pharmacotherapeutic targets at serotonin , dopamine and g -aminobutyric acid

systems. p. 434–458, 2002.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 367, n. 4, p. 245–251, 6 abr. 1996.

MIYAZAKI, I.; ASANUMA, M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. **Acta Medica Okayama**, v. 62, n. 3, 2008.

MODI, N. B. et al. Dose-Proportional and Stereospecific Pharmacokinetics of Methylphenidate Delivered Using an Osmotic, Controlled-Release Oral Delivery System. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 10, p. 1141–1149, 1 out. 2000.

MORRIS, R. W. et al. The effect of gonadectomy on prepulse inhibition and fear-potentiated startle in adolescent rhesus macaques. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 6, p. 896–905, 2010.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J. H. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. [s.d.].

NEDELEC, M. J. LE; ROSENGREN, R. J. Methylphenidate inhibits cytochrome P450 in the Swiss Webster mouse. n. April, p. 273–280, 2002.

NELSON, R. J.; CHIAVEGATTO, S. Molecular basis of aggression. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 12, p. 713–9, 1 dez. 2001.

NIKINMAA, M.; RYTKÖNEN, K. T. Functional genomics in aquatic toxicology-Do not forget the function. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4 SUPPL., p. 16–24, 2011.

NIKOLAUS, S. et al. In-vivo quantification of dose-dependent dopamine transporter blockade in the rat striatum with small animal SPECT. **Nuclear Medicine Communications**, v. 28, n. 3, p. 207–213, mar. 2007.

NOGUEIRA, L. et al. Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1–4, p. 243–255, 2011.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 311–319, 2013.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–312, 1 dez. 2001.

NUNES, B. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 2, n. 1, p. 9–20, 2010.

NÜRNBERGER, A. et al. Subapical Localization of the Dopamine D₃ Receptor in Proximal Tubules of the Rat Kidney. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52, n. 12, p. 1647–1655, 26 dez. 2004.

OLIVIER, B.; VAN OORSCHOT, R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, n. 1–3, p. 207–217, 5 dez. 2005.

OOST, D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. v. 13, 2003.

ÖSTMAN, M. et al. Science of the Total Environment A snapshot of illicit drug use in Sweden acquired through sewage water analysis. **Science of the Total Environment, The**, v. 472, p. 862–871, 2014.

PAL, A. et al. Science of the Total Environment Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources : Review of recent occurrences , sources , fate and effects. **Science of the Total Environment, The**, v. 408, n. 24, p. 6062–6069, 2010.

PANKHURST, N. W.; BARNETT, C. W. Relationship of Population Density, Territorial Interaction and Plasma Levels of Gonadal Steroids in Spawning Male Demoiselles *Chromis dispilus* (Pisces: Pomacentridae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 90, n. 2, p. 168–176, 1 maio 1993.

PARENT, A.; DESCARRIES, L.; BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3h]5-hydroxytryptamine. **Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 115–138, 1 fev. 1981.

PARIKH, V. N.; CLEMENT, T. S.; FERNALD, R. D. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. **Behavioural Brain Research**, v. 166, n. 2, p. 291–295, 30 jan. 2006.

PARSEY, R. V. Serotonin Receptor Imaging: Clinically Useful? **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 10, p. 1495–1498, 1 out. 2010.

PATRICK, K. S. et al. Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 241, n. 1, p. 152–8, abr. 1987a.

PATRICK, K. S. et al. Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 81, n. 3, p. 346–53, mar. 2007.

PATRICK, S. et al. of the Enantiomers. p. 152–158, 1987b.

PEAKALL, D. **Animal Biomarkers as Pollution Indicators**. [s.l.] Springer Netherlands, 1992.

PEREIRA, T. S. CREMI. B. et al. Anti-androgenic activities of diuron and its metabolites in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 164, p. 10–15, 2015.

PEREIRA TRÍDICO, C. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 858–863, 2010.

PETROVIC, M. et al. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 2146–2156, out. 2002.

POTTER, P. M.; WADKINS, R. M. Carboxylesterases – Detoxifying Enzymes and Targets for Drug Therapy. p. 1045–1054, 2006.

- QUANSAH, E. et al. Methylphenidate alters monoaminergic and metabolic pathways in the cerebellum of adolescent rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 513–528, 2018.
- QUINN, G. P. et al. **Experimental design and data analysis for biologists**. [s.l.: s.n.]. v. 277
- RALEIGH, M. J. et al. Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. **Brain Research**, v. 559, n. 2, p. 181–190, 20 set. 1991.
- REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106–117, 2014.
- RENTON, K. W. Cytochrome P450 Regulation and Drug Biotransformation During Inflammation and Infection. p. 235–243, 2004.
- RICO, E. P. et al. Neurotoxicology and Teratology Zebra fish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 608–617, 2011.
- RISSO-DE FAVERNEY, C. et al. The nitroxide stable radical tempo prevents metal-induced inhibition of CYP1A1 expression and induction. **Toxicology Letters**, v. 111, n. 3, p. 219–227, jan. 2000.
- ROBINSON, S. et al. Neonatal loss of γ -aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 104, n. 6, p. 396–408, jun. 2006.
- ROESSNER, V. et al. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 1183–1191, 2 jun. 2010.
- ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 479, n. 1–3, p. 23–40, 31 out. 2003.
- RUHOY, I. S.; DAUGHTON, C. G. Beyond the medicine cabinet: An analysis of where and why medications accumulate. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1157–1169, 1 nov. 2008.
- SAKURAGUI, M. M. et al. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 41–51, jul. 2013.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Response and Recovery of Brain Acetylcholinesterase Activity in the European Eel, *Anguilla anguilla*, Exposed to Fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, n. 3, p. 205–209, dez. 1997.
- SANGHANI, S. P. et al. Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 10, p. 1207–14, 2009.
- SATO, T.; HOSOKAWA, M. Toxicology Letters Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. v. 82183, p. 439–445, 1995.
- SCHMEICHEL, B. E.; BERRIDGE, C. W. Wake-promoting actions of noradrenergic α_1 - and

β -receptors within the lateral hypothalamic area. **European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 6, p. 891–900, mar. 2013.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHULTZ, M. M.; FURLONG, E. T. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Environmental Matrices by LC / ESI / MS / MS a) b. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 1756–1762, 2008.

SEEMAN, P.; MADRAS, B. K. Anti-hyperactivity medication: Methylphenidate and amphetamine. **Molecular Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 386–396, 1998.

SIRIS, S. G. et al. Effects of dopamine blockade on gonadotropins and testosterone in men. **American Journal of Psychiatry**, v. 137, n. 2, p. 211–214, fev. 1980.

SMITH, G. M. et al. Behavior and brain chemistry correlates in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) from polluted and unpolluted environments. **Marine Environmental Research**, v. 39, n. 1–4, p. 329–333, 1 jan. 1995.

SOLANTO, M. Dopamine Dysregulation in AD / HD : Integrating Clinical and Basic Science Research. **Behavioral Brain Research**, v. 130, p. 65–71, 2002.

SOLÉ, M. et al. Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1708–1716, 2006.

STANDAERT, D.; GALANTER, J. M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia**, p. 166–185, 2009.

STEGEMAN, J. J. Cytochrome P450 Forms in Fish. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 1993. p. 279–291.

SUN, Z. et al. Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 469–476, 2004.

SUN, Z. Methylphenidate Is Stereoselectively Hydrolyzed by Human Carboxylesterase CES1A1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 469–476, 2004.

SURMEIER, D. J. et al. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 228–235, 1 maio 2007.

SWANSON, J. .; VOLKOW, N. . Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of stimulants: implications for the design of new treatments for ADHD. **Behavioural Brain Research**, v. 130, n. 1–2, p. 73–78, mar. 2002.

TAKAHASHI, A.; MICZEK, K. A. Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 17, p. 3–44, 2014.

TEO, S. K. et al. D-Methylphenidate is non-genotoxic in in vitro and in vivo assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 537, n. 1, p. 67–79, 2003.

TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. v. 938, p. 175–185, 2001.

TIBERI, M. et al. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 17, p. 7491–5, 1 set. 1991.

TIDEY, J. W.; MICZEK, K. A. Heightened aggressive behavior during morphine withdrawal: effects of d-amphetamine. **Psychopharmacology**, v. 107, n. 2–3, p. 297–302, 1992.

TORRES, N. H. et al. FÁRMACOS NO AMBIENTE – REVISÃO. p. 67–75, 2012.

TREVISAN, R. et al. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. **Aquatic Toxicology**, v. 173, p. 105–119, abr. 2016.

TRIEBSKORN, R. et al. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 57–73, 1997.

TURNER, L.; PH, D. No Title. 2002.

TZAVARA, E. T. et al. Procholinergic and memory enhancing properties of the selective norepinephrine uptake inhibitor atomoxetine. p. 187–195, 2006.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. **Science of The Total Environment**, v. 429, p. 123–155, 1 jul. 2012.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALVES DE ALMEIDA, E.; LÓPEZ-BAREA, J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 5, p. 1784–1797, 2009.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; DE ALMEIDA, E. A.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 145, n. 3, p. 404–412, 2007.

VIRMANI, A. et al. The Protective Role of l-Carnitine against Neurotoxicity Evoked by Drug of Abuse, Methamphetamine, Could Be Related to Mitochondrial Dysfunction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 965, n. 1, p. 225–232, 24 jan. 2006.

VOLAVKA, J. The Neurobiology of Violence. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 11, n. 3, p. 307–314, 1 ago. 1999.

VOLKOW, N. D. et al. Is Methylphenidate Like Cocaine? **Archives of General Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 456, 1 jun. 1995.

VOLKOW, N. D. et al. Dopamine Transporter Occupancies in the Human Brain Induced by Therapeutic Doses of Oral Methylphenidate. **American Journal of Psychiatry**, v. 155, n. 10,

p. 1325–1331, out. 1998.

VOLKOW, N. D. et al. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: New model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1410–1415, 2005.

VOLPATO, G. L.; BARRETO, R. E. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 34, n. 8, p. 1041–5, ago. 2001.

VOLZ, T. J. et al. Methylphenidate-Induced Increases in Vesicular Dopamine Sequestration and Dopamine Release in the Striatum: The Role of Muscarinic and Dopamine D2 Receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 1, p. 161–167, 11 jul. 2008.

WARGIN, W. et al. Pharmacokinetics of Methylphenidate. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 226, n. 2, p. 382–386, 1983.

WAYMENT, H. K. et al. Effects of Methylphenidate Analogues on Phenethylamine Substrates for the Striatal Dopamine Transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 3, p. 1266–1274, 7 jul. 2008.

YANG, D. et al. Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: Ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 238–247, 15 jan. 2009.

ZHU, H.-J. et al. Two CES1 Gene Mutations Lead to Dysfunctional Carboxylesterase 1 Activity in Man: Clinical Significance and Molecular Basis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 6, p. 1241–1248, jun. 2008.

ZHU, H.-J. et al. Age- and Sex-Related Expression and Activity of Carboxylesterase 1 and 2 in Mouse and Human Liver. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 9, p. 1819–1825, 1 set. 2009.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond : acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. p. 655–669, 2006.