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. Drª. 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 concedider 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 Drª 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 Drª 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 presentearem 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 recaptação 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. Observarmos 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 pharmaceuticauls in the aquatic environment has increased in the last decades, causing biochemical, physiological and behavioral effects in aquatic organisms. In general, water pollution by pharmaceuticauls 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 recapitation transporters (3,4-dihydroxyphenylethanamine; 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 serotoninergic 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 serotonine (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: pharmaceuticauls, 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. Oreochromis niloticus (Tilápia do Nilo) 32

Capítulo 1

Figure 1. Total frequency of displays and attacks of *O. niloticus* 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 *O. niloticus* 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), tirosyne hidroxylase (E), carboxylesterase 2 (F), carboxylesterase 3 (G) and enzymatic activity of carboxylesterase (H) of *O. niloticus* 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) glutationa peroxidase (GPx) em fígado e brânquias de *O. niloticus* 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-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) e (B) 7-benzilóxiresorufina O-desalquilase (BROD) em fígado e brânquias de *O. niloticus* 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 *O. niloticus* 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-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase
CbE	Caroxilesterase
DA	3,4-dihidroxi-feniletanamina
DAT	Transportador de dopamina
EROD	etoxiresorufina-*O*-deetilase
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
5-HT	5-hidroxitriptamina
MF	Metilfenidato
NE	Norepirefrina
T	Testosterona
TDAH	Transtorno de Défict de Atenção e Hiperatividade
TH	Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

1.1 ***Fármacos no ambiente aquático*** 19

1.2 **Metilfenidato** 21

1.3 ***Dopamina e serotonina*** 23

1.4 ***Biomarcadores de poluição ambiental*** 27

1.5 ***A tilápia como organismo teste*** 31

2. OBJETIVO 35

2.1 ***Objetivo geral*** 35

2.2 ***Objetivo específico*** 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 modularem 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 $\mu g.L^{-1}$ (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

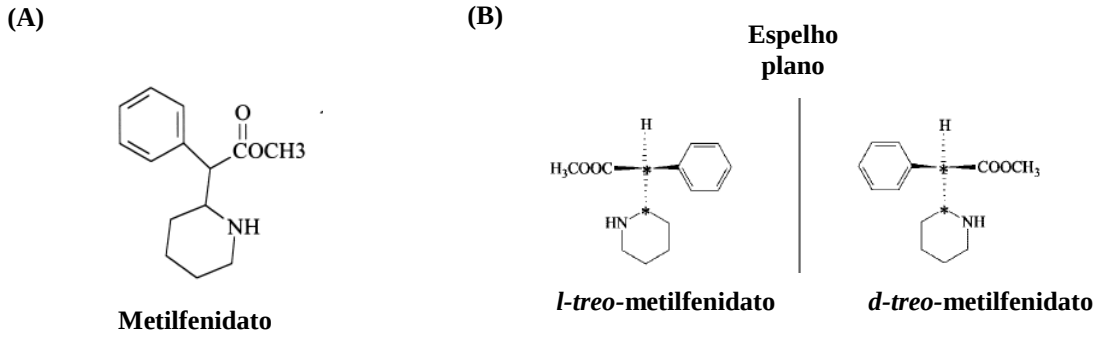
(2016), detectaram 33 amostras de uma lagoa e de canais de irrigação da Espanha, contaminadas por pelo menos um de 17 fármacos encontrados na região e analisados, sendo que o ibuprofeno e a codeína foram os mais frequentemente detectados. Matamoros e colaboradores (2012) também constataram a presença 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 Hipertatividade (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 terapeuticamente 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)



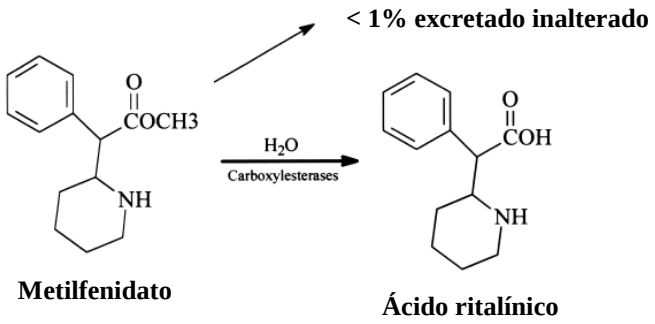
O efeito terapêutico do MF no tratamento de TDAH está envolvido principalmente no aumento do nível de dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina; DA) extracelular no cérebro (CASTELLANOS et al., 1996; VOLKOW et al., 1995). Essa ação ocorre por que o MF se liga aos transportadores de recaptação da dopamina (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 noreprirefrina [(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 auto-reguladoras 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), demostraram que o tratamento biológico de águas residuais não é suficiente para eliminar ácido rialínico 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,

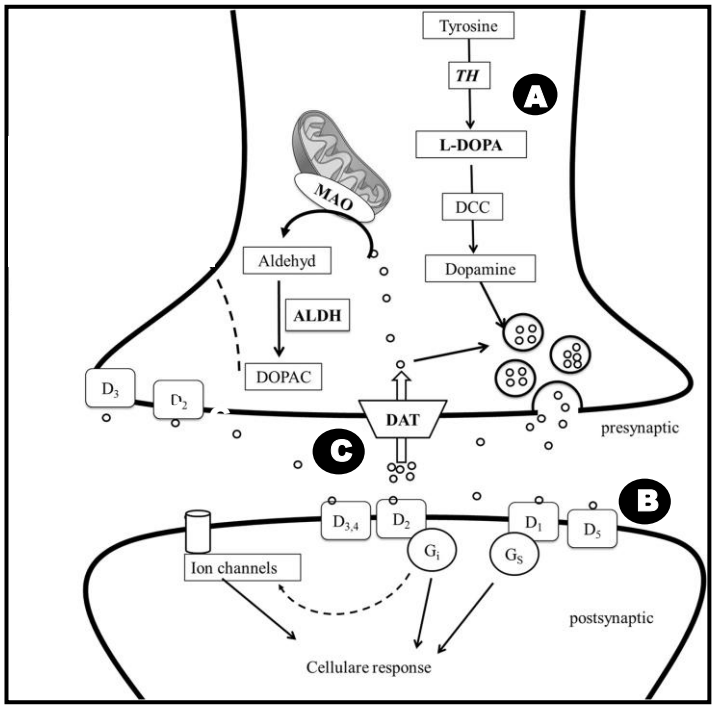
causadas por exposição a agentes estressores, podem resultar em alterações comportamentais nos peixes (BOSCOLO et al., 2018a; DE SERRANO; FONG; RODD, 2016; LEVIN et al., 2011). O comportamento é o resultado das interações de um organismo com seu ambiente externo, integrando processos fisiológicos, bioquímicos, 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: desacarboxilase; DOPAC: ácido diidroxifenilacético; DAT: transportador de dopamina; MAO: monoamina oxigenasse; TH: tirosina hidroxilase (BARTL et al. (2017) com algumas modificações)



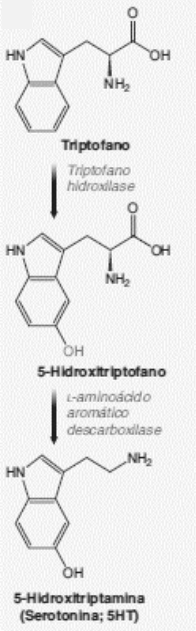
O DAT é uma proteína de membrana plasmática que funciona para transportar o DA extracelular de volta para o citoplasma das células pré-sinápticas (WAYMENT et al., 2008) (Fig 3C). A principal atuação do MF está relacionada com a inibição do DAT, causando um aumento nos níveis dessa monoamina na fenda 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*

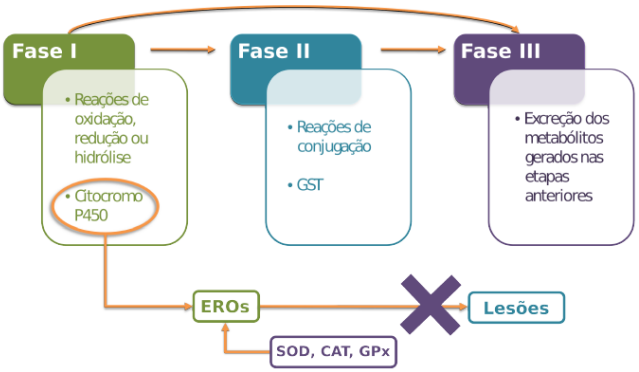
O uso de biomarcadores em estudos de monitoramento tem sido uma ferramenta que possibilita a determinação de efeitos adversos causados em organismos aquáticos expostos a concentrações subletais de diferentes tipos de contaminantes (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dentre esses biomarcadores, os bioquímicos, 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 microssomais, 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 receberam 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 glutationa tranfesrase (GST), que catalisam as reações adicionando a glutationa reduzida (GSH) ao composto original ou metabólito resultante da fase I, originando um conjugado de glutationa 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 ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) 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.

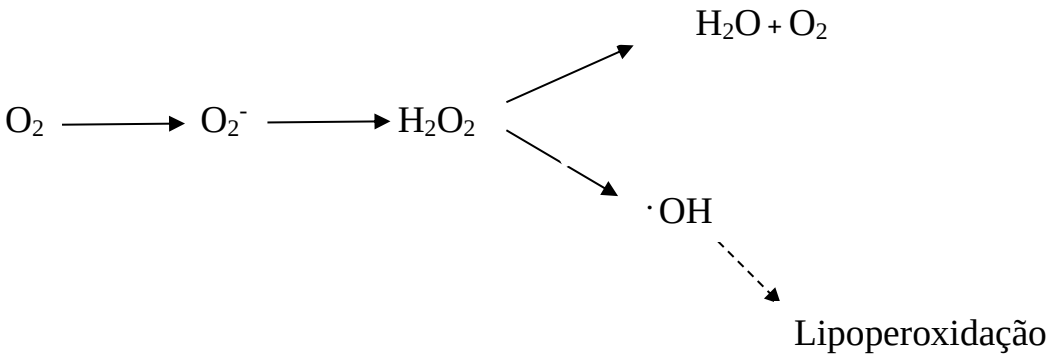
$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^{\bullet-} \xrightarrow[2H^+]{e^-} H_2O_2 \xrightarrow{e^-} {\bullet}OH + OH^- \xrightarrow[2H^+]{e^-} 2H_2O \qquad \text{(Reação 1)}$$

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 glutationa 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 acumulo 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) (SATOH; 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 H_2O_2, 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, consequentemente, evita problemas de bem-estar que surgem entre dois animais colocados juntos, onde um pode prejudicar a saúde do outro (ELWOOD et al., 2014).

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos bioquímicos, moleculares e comportamentais que o metilfenidato, em concentrações ambientalmente relevantes, pode causar em machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus).*

2.2 *Objetivo específico*

- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT e GPx), enzimas de biotransforação (EROD e BROD), níveis de peroxidação lipídica (TBARs) e esterases (AChE e CbE) no fígado e nas brânquias das tilápias e a CbE no encéfalo das tilápias.

- Avaliar os efeitos do metilfenidato nos níveis da dopamina e serotonina e verificar a relação desses resultados com o comportamento agressivo dos animais.

- Avaliar os níveis dos transcritos de genes dos receptores D1, D2 e D5 da dopmina, assim como dos transportadores de DA, das isoformas da enzima carboxilesterase (CES 2 e CES 3) e da enzima tirosina hidroxilase no encéfalo das tilápias.

METODOLOGIA E RESULTADOS

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados desse estudo estarão descritos no decorrer dos dois capítulos apresentados a seguir. Os dois capítulos são referentes ao mesmo experimento, porém, devido aos elevados custos das análises moleculares e a escassez de verba para a pesquisa, optamos, no capítulo 1, por avaliar apenas os níveis de transcritos dos peixes controle e expostos às concentrações de 20 e 100 $ng.L^{-1}$ de MF. No capítulo 2, focado em biomarcadores bioquímicos, além desses grupos, um outro grupo exposto a 200 $ng.L^{-1}$ de MF foi também avaliado.

Capítulo 1: "Effects of methylphenidate on the aggressive behavior and brain dopaminergic system of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)"

Artigo submetido na revista Chemosphere, como pré requisito exigido pelo Programa de Pós Graduação em Biociências, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/IBILCE

Capítulo 2: "Avaliação de biomarcadores bioquímicos em tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)* expostas ao metilfenidato"

Capítulo 1

Effects of methylphenidate on the aggressive behavior and brain dopaminergic system of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Isabela Gertrudes Batalhão[1], Daína de Lima[2], Ana Paula Montedor Russi[3], Camila Nomura Pereira Boscolo[4,] Danilo Grunig Humberto Silva[1], Afonso Celso Dias Bainy[2], Eduardo Alves de Almeida[5]

[1]*UNESP - Sao Paulo State University, Department of Chemistry and Environmental Sciences, São Paulo, Brazil*
[2]*UFSC- Federal University of Santa Catarina, Department of Biochemistry, Florianópolis, SP, Brazi*
[3]*UNESP - Sao Paulo State University, Department of Physiology, Jaboticabal, SP, São Paulo, Brazil*
[4]*UNIRP- University Center of Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil*
[5]*FURB Fundação Universidade Regional de Blumenau, Department of Natural Sciences, Blumenau, SC, Brazil*

*Correspondent author: edualves1976@hotmail.com

Abstract

The occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment has increased considerably in the last decades, causing negative biochemical, physiological and behavioral effects in aquatic organisms. In this context, in this study we evaluated the effects of methylphenidate (MPH) on the aggressive behavior, dopaminergic and serotoninergic system, monoamine levels, and carboxilesterase transcript levels and activity of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish were exposed for 5 days to MPH at 20 and 100 $ng.L^{-1}$ (single dose exposure). Fish exposed to 100 $ng.L^{-1}$ of MPH showed increased aggressiveness and decreased dopamine (DA) and serotonin (5-HT) levels (2.4- and 3.9-fold, respectively). No changes were observed in plasma testosterone levels and in the transcript levels of genes of dopamine receptors (*D1*, *D2* and *D5*), tyrosine hydroxylase (*TH*), dopamine transporter (*DAT*), and carboxylesterase 2 (*CES2*), despite the transcript levels of carboxylesterase 3 (*CES3*) was downregulated at 100 $ng.L^{-1}$ of MPH. Carboxylesterase activity was also unchaged. The results suggest that although MPH increased the aggressiveness of animals, this effect was not related to the dopaminergic system, but a consequence of a significant decrease in 5-HT and DA levels in the brain, possibly related to decreased fear emotions and increased anxiety. Possible effects on noradrenergic system should be not disregarded, but this remains to be further investigated.

Keywords: Nile tilapia, methylphenidate, aggressiveness, dopaminergic system, serotonin.

Highlights

Nile tilapia was exposed methylphenidate (MPH).

MPH increased the aggressive behavior of tilapia.

MPH decreased brain dopamine and serotonin levels.

MPH did not alter dopamine receptor and tyrosine hydroxylase mRNA levels.

1. Introduction

Prescriptions of anxiolytic and antidepressant compounds for treatment of behavioral disorders have substantially increased in last decades. As a consequence, the amount of these

pharmaceuticals and their metabolites in wastewater and, consequently, in surface water have also increased [1–5]. After reaching the aquatic environment these compounds may interfere with the ecosystem affecting non-target organisms, leading to physiological and behavioral alterations, even at low concentrations (i.e. ng.L^{-1}) [6–8]

Methylphenidate (MPH), the active component of Ritalin® formulation is a stimulant of the central nervous system (CNS), and is one of the most prescribed drugs in the last 50 years for children and adolescents diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) [9–11]. Significant amounts of this compound and its metabolite, ritalinic acid, has been reported in aquatic environment [12,13], however there are still few studies focused on the negative effects of these compounds to aquatic organisms.

Most psychostimulants, including MPH, are known to interact with monoamine-responsive neurons of the CNS [14,15]. Pharmacogenetic studies have reported genes related to the dopaminergic system as a primary site of action of MPH [16]. MPH may bind to the dopamine reuptake transporter (DAT) present in presynaptic membrane [17] blocking the reuptake of both dopamine (3,4-dihydroxyphenylethanamine; DA), norepirephrine ((R)-2-amino-1-3,4-dihydroxyphenyl; NE) [18,19], and in a lower proportion, serotonin (5-hydroxytryptamine; 5HT). By inhibiting the presynaptic reuptake and, consequently, increasing the amount of these neurotransmitters in the synaptic cleft [20,21], MPH improves the behavioral alertness of the organism [12]. In mammals, behavioral effects of MPH peak 1 to 2 hours after administration and tend to dissipate in 3 to 5 hours. MPH biotransformation occurs mainly in the liver, generating ritalinic acid as the main inactive metabolite [22], by action of the enzyme carboxylesterase CES1A1 [23].

Previous studies showed that *Danio rerio* embryos exposed to 50 mg. L^{-1} of MPH for five days presented increased brain levels of DA, NE and 5-HT accompanied by changes in swimming speed in the novel tank behavior test [24]. Kristófersdóttir et al. [25], observed a reduction of mobility in *D. rerio* exposed to three doses of MPH (4.62, 9.25 and 18.50 μmol), suggesting a possible toxic effect in the fish caused by MPH exposure. Moreover, MPH improved the exploratory behavior of the fish *Poecilia reticulata* to novelty, probably due to an increase in DA levels [26].

DA and 5-HT play a key role on the development of the CNS of vertebrates [27]. The dopaminergic system is related to synaptic transmission of motor function, cognition, emotion, hormonal homeostasis and neuroendocrine secretion [28,29]. Nonetheless, according to Gamo et al. [30] the excessive release of catecholamines, either due to stress or exposure to stimulant drugs, impairs functions of the limbic system. In addition, it has previously reported that an

increase in DA levels may be associated to increase of aggressive behavior in rats after omission of scheduled reward [31]. Increased DA levels due to exposure to the pollutant exposure (the herbicide diuron and diuron metabolites) were also associated with increased aggressiveness in male Nile tilapia, an effect that was also possibly related with a positive DA modulation of testosterone levels [32].

The first step in DA synthesis is the conversion of the amino acid tyrosine into L-DOPA (1,3,4-dihydroxyphenylalanine or levodopa) by the action of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH). This step is the most important for the synthesis of DA and other catecholamines, such as NE. Thereafter, the conversion of L-DOPA in DA is performed by the enzyme aromatic L-amino acid decarboxylase [33]. The physiological actions of DA are mediated by five G protein-coupled receptors. In mammals, these receptors are divided into D1 class (D1 and D5 receptors) and D2 class (D2, D3 and D4 receptors), based on the ability to modulate cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production and due to differences in their pharmacological characteristics [34,35]. Several studies reported the influence of D1, D2 and D3 receptors on the modulation of aggressiveness in mammals [36,37].

5-HT can regulate perception, aggressiveness, anxiety, reproduction, appetite and pain [38], therefore influencing sensitivity to environmental factors [39]. Several studies showed that high levels of 5-HT may decreased the aggressive behavior in different species [40]. The neurotransmitter 5-HT belongs to the group of monoamines along with catecholamines [41], and is synthesized from the amino acid tryptophan by the enzyme tryptophan hydroxylase (TPH), which converts tryptophan to 5-hydroxytryptophan. Next, the aromatic L-amino acid decarboxylase converts 5-hydroxytryptophan into serotonin [33].

Taking into account previous findings that shows that MPH promotes alterations in the dopaminergic system in vertebrates nervous system [24,30], and that the dopaminergic system is an important modulator of aggressive behavior in fish [32], in this study we were interested to evaluate the possible relationships between MPH effects on the aggressive behavior and biochemical and molecular makers of brain dopaminergic system in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). We hypothesized that MPH exposure for five days at environmentally relevant concentrations would be able to block the DA transporters, increasing the DA level in synaptic clef of the fish brain neurons, causing an exacerbated stimulation of the postsynaptic DA receptors, and increasing aggressiveness of the fish. In response to these effects on the dopaminergic system, we also hypothesized that neurons would trigger the modulation of transcription of genes of DA receptors and DA transporter, as well as the gene of the key enzyme of DA synthesis (TH). Moreover, we checked if possible alterations on brain DA levels

correlates with plasmatic T levels and/or brain 5-HT levels. Finally, considering that MPH is metabolized by carboxylesterases (CbE), we also checked if MPH exposure affects the transcript levels and the enzymatic activity of this enzyme.

2. Methods

2.1. Animals and housing

Adult males of *O. niloticus* with similar size (12.9 ± 1.2 cm, 61.4 ± 18.2 g) were obtained from an aquaculture facility of the São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil. Fish were randomly selected and acclimatized for 30 days in 500 L tanks (5 L per fish), under constant aeration at 27 °C, and 12L:12D photoperiod (Boscolo et al., 2011). Animals were fed twice a day with a commercial food (Guabi-Pirá/Brazil). This study was conducted in agreement with the precepts of National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Ethics Committee for Animal of UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil (protocol n° 109/2015).

2.2. Methylphenidate exposures

After the acclimatization period, fish were randomly divided in three groups of nine fish (N=9) that were individually placed in aquariums containing 17 L of dechlorinated tap water. The fish were exposed for five days to the following treatments: one control group (without MPH), one group exposed to a single concentration of 20 $ng.L^{-1}$ of MPH, and one group exposed to a single concentration of 100 $ng.L^{-1}$ of MPH. To our knowledge, there are no studies reporting average MPH concentrations in natural aquatic environments. Thus, the concentrations of MPH used in this study were chosen based on a study in Sweden sewage treatment plants that estimated MPH load per capita as being 1 to 25 $\mu g.day^{-1}$ [42], despite the actual final concentration in effluents were not evaluated. In another study, Letzel et al. [12] reported that the concentration of ritalinic acid, the main metabolite of MPH, in the wastewater effluents in Germany were in the range of <50-170 $ng.L^{-1}$, corresponding to a mean specific load per capita of 17.7 $\mu g.day^{-1}$. Considering similar per capita loads of MPH in Sweden and of ritalinic acid in Germany, we estimated that MPH levels in German effluents would be similar to ritalinic acid concentration in effluents from Sweden. It should be also considered that in Brazil (207.7 million inhabitants), similar to other countries, about 50% of sewage does not receive any kind of treatment, being directly discharged into the aquatic environments. So, despite data about MPH concentrations in natural aquatic environments is lacking, we choose concentrations that would represent, at least, a worst scenario of MPH contamination.

Methylphenidate (>98% purity, Sigma-Aldrich, CAS: 1219804-02-0) was dissolved in acetone (>98% purity, Sigma-Aldrich, CAS 67-64-1) and added to exposure aquaria to achieve selected concentrations at a final acetone concentration of 0.001% (v/v). In order to minimize the solvent effects, control group were also exposed to same volume of acetone.

The fish were fed during the experimental period with same ration used in the acclimatization period, corresponding to 3% of biomass, offered once a day. The photoperiod remained 12:12 h and no differences were observed in water dissolved O_2 (5.3 ± 1.4 mg.L^{-1}), pH (7.8 ± 1.1), temperature (25.8 ± 1.6 ºC) and unionized ammonia (0.09 ± 0.05 mg.L^{-1}), among the experimental groups, during five days of exposure.

2.3. Behavior trials

In the last two days of the MPH exposure period, the aggressive behavior of the fish was evaluated by mirror tests. The aquariums in which the fish were placed had all lateral walls covered by blue adhesive plastic to block visual contact between animals from different aquariums, also avoiding excessive cortisol production by the fish [43]. One mirror (12 x 16 cm; width × height) was placed in the posterior wall of the aquarium to evaluate the aggressive interactions of the fish with their self-images. The fish were then filmed during 10 min at the 4^{th} and 5^{th} day of exposure to MPH (the test was repeated in consecutive days to check the consistency of the test). The aggressive interactions were analyzed using the ethogram proposed by Barreto et al. [44] for Nile tilapia, and expressed as the total frequency of displays and attacks.

2.5. Blood collection and testosterone analysis

After the behavioral tests, animals were captured and anaesthetized with benzocaine (9 mg. L^{-1}) for blood sampling, using a hypodermic needle and heparinized syringes (Liquemin, Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Blood was centrifuged at 3.000 *g* for 10 min and then the plasma was collected and frozen at −20 °C. Testosterone levels were assayed in the plasma samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using a commercial kit (IBL-Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Germany) validated for GIFT Nile tilapia [45], according to the methods described by Brown et al. [46].

2.5. Neurotransmitter analyses

Following blood sampling, animals were euthanized by a lethal dose of benzocaine (28 mg. L^{-1}), and had their brain removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. The monoamines DA and 5HT were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according Benedetto et al. [47], with minor modifications. Brain samples were individually weighted (20 mg) and homogenized in 200 µL of perchloric acid (0.2 µM) with cysteine (3 mM). The homogenate was centrifuged (12,000 *g*, at 4 ºC for 10 minutes) and the supernatant was filtered through a 0.22-µm filter and kept 5 minutes in ice. Subsequently, 10 µL of the filtrate was injected into the HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), consisted of one CBM20A communication bus module, two LC20AD-XR pumps, one DGU20A3 R degassing unit, one SIL20AC-XR auto sampler, and one CTO20AR column oven. The components of the sample were separated in an ACE C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm) and the column was maintained at 35 °C during analyses. The mobile phase (acetic acid 12 mM, Na_2-EDTA 0.26 mM, with 10% methanol) was pumped at an isocratic flow of 1 mL min^{-1}. The monoamines were monitored with a fluorescence detector (Shimadzu, model RF-20 A) set with wavelength of 279 nm of excitation and 320 nm of emission. Chromatogram monitoring and peak identification and quantification were performed using the LAB Solutions 5.71 software (Shimadzu Corporation). The concentrations of monoamines were calculated based on a calibration curve prepared according to same procedure described above for the samples using authentic DA and 5HT standards (>98% purity, Sigma-Aldrich Chemical; St. Louis, MO, USA).

2.6. Carboxylesterase assay

Brain pieces were individually homogenized in 1:4 (w/v) buffer (0.1 M TRIS-HCl, pH 8.0), centrifuged at 10.000 g for 30 min at 4 °C and enzymatic activity was quantified in the supernatant (cytosolic fraction). The esterase activity was measured according to Ellman et al. [48], monitoring the formation of the product of the reaction between the thiol-derivative of the substrate phenylthioacetate with 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 412 nm and 25 °C. Total protein concentration was quantified according to Bradford [49], using bovine serum albumin as standard. Quantification of enzyme activity and protein concentrations were performed on Victor TM X3 (Perkin Elmer) microplate reader and enzymatic activity was expressed in U/mg of protein.

2.7. Total RNA isolation and cDNA synthesis by reverse transcription

Total RNA was isolated from brain samples using TRIzol (Invitrogen), according to manufacturer's protocol, with minor modifications. Samples were manually disrupted with a pistil in 1 mL of TRIzol. After homogenization, homogenates were maintained at room temperature for 1 h. Chloroform was added to the tube to separate aqueous and organic phases by centrifugation. The RNA contained in the aqueous phase was precipitated by addition of isopropanol, pelleted and washed with ethanol 75% before being dissolved in RNase-free water. RNA concentration and quality were measured in a spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). For reverse transcription 1 µg of total RNA was treated with DNase and reverse transcription were performed using QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Samples were diluted and stored at -20 °C.

2.8. Primers design and real time quantitative PCR analysis

For analysis of relative levels of gene transcripts, by quantitative real time PCR (qPCR), nine sequences of *O. niloticus* were selected from *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Primers for qPCR were designed using Primer Quest software and the quality parameters were analyzed in OligoAnalyzer tool, availables at www.idtdna.com (Integrated DNA Technologies). Primer pairs of the selected genes are shown in Table 1.

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

Gene name	**Symbol**	**Primer sequence 5' - 3'**	**Function**
Carboxylesterase 2	*CES 2*	F - CACAACTTTGGAGGAGACCCAGGATTAG R - CTCAGCAATGGCACGGTGAAACA	Hydrolysis of ester- and amide-bond-endogenous organic compounds
Carboxylesterase 3	*CES 3*	F - GCAGCCTTGAAAGCACAAAGAAGATCAG R - ACGAAACAGCTCATCCACAGGTTTAGTC	Hydrolysis of ester- and amide-bond-endogenous organic compounds
Dopamine receptor 1	*DR 1*	F - CATGGAAGGCAGCGACAGAGATTG R - AGATGGAGGCAGTGGAGCACATTA	Dopamine receptor
Dopamine receptor 2	*DR 2*	F - ACCCTTCATCATCACTCTGCTCGT R - CTGAGAGACACGCTGCTTTGGTTT	Dopamine receptor
Dopamine receptor 5	*DR 5*	F - GGAACAGCACTGAAAATGAGGCAA R - GCAGGGTCCATAGGATAAGCAGAGAAA	Dopamine receptor
Dopamine transporter	*DAT*	F - TGACTCCAACTCCGACTCAGACTAAC R - CCTCCAGACATTTGCCAGATCCA	Dopamine transporter
Tyrosine hydroxylase	*TH*	F - AACCAGCTCCACATCCTCCACAAA R - CTCTGCCGTCTACCGACGAATCT	Catecholamine biosynthesis
Normalizing genes			
β-*actin*	*ACT*	F - CGAGCTGTCTTCCCATCCA R - TCACCAACGTAGCTGCTTTCTG	Cytoskeletal protein
Elongation factor-1-α	*EF1*	F - CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R - ATCAAGAAGAGTACCGCTAGCATTAC	Protein synthesis

The transcript levels of selected genes were analyzed by qPCR using QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Real time reactions were performed with 100 ng of cDNA and 0.7 mM of each primer, per reaction, using a Rotor-Gene TM 6000 thermocycler (Qiagen). The qPCR amplification was performed using the fast 2-step cycling program as follows: 2 min at 95 °C (activation) followed by 40 cycles of 5 s at 95 °C (denaturation) and 10 s at 60°C (annealing and extension). The PCR product was subjected to melting curve analysis to verify the specificity of the products formed for each gene. qPCR efficiency (E) was determined for each primer pair and checked by running a cDNA calibration curve. The 2^{-Cq} method was used to test and choose reference genes [50]. To ensure a robust normalization of each gene of interest, geometric mean of two reference genes was calculated (*ACT* and *EF1*) and all data were normalized relatively to control group.

2.9. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). The normality of the data was verified using Normal Probability Plots of Residuals while homoscedasticity was checked by Levene's test, assuming a significance level of 0.05.

Outliers were identified by the Box plots test and the values were replaced by the median of the respective group, when appropriated. Experimental groups were compared by the General Linear Model (GLM) for parametric data [51,52]. When appropriate, we applied Fisher post hoc test to evaluate any significant difference among groups. The graphs were made using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and the data were expressed as mean ± 95% confidence intervals of their biological values and $P < 0.05$ was considered statistically significant [51,52].

3. Results

3.1. Behavior trials

Exposure to 100 $ng.L^{-1}$ of MPH significantly altered fish behavior, increasing of aggressiveness when compared to the control group (0.49-fold) and to the group exposed to 20 $ng.L^{-1}$ (1.92-fold) (Figure 1). Exposure to 20 $ng.L^{-1}$ of MPH did not change the aggressive behavior, compared to the control group.

3.2. Neurotransmitter and testosterone levels

The levels of the neurotransmitters DA and 5-HT in the brain of control fish and fish exposed to MPH for 5 days are shown in figure 2. DA and 5-HT levels were significantly lower (2.4- and 3.9-fold, respectively) in the groups exposed to 100 $ng.L^{-1}$ of MPH compared to the control group. 5-HT levels were also significantly lower (4.13-fold) in the group exposed to 100 $ng.L^{-1}$ when compared to the group exposed to 20 $ng.L^{-1}$. We did not observe differences in testosterone levels among the experimental groups after 5 days of exposure (Figure 2).

3.3. Gene transcription and CbE activity

The results showed that there were no differences in the transcript levels of any of *DA* receptors genes analyzed. Furthermore, we did not observe differences in *DAT* and in *TH* transcript levels (Figure 3). Regarding to CES transcript levels, only *CES 3* was 1-fold lower in the group exposed to 100 $ng.L^{-1}$ compared to the control group. Moreover, CbE activity did not show any differences among the experimental groups.

4. Discussion

In mammals, MPH is an inhibitor of DA and NE reuptake, blocking the capture of these catecholamines by the pre-synaptic nerve cell terminations, and thus preventing them from being removed from the synaptic space [53–57]. As a result, extracellular DA and NE remain active for longer in the synaptic clefts, significantly increasing their effects on the respective postsynaptic cell receptors. In the present study we tested the hypothesis that MPH at environmentally realistic concentrations in water could exert its effect on the blockade of the DA reuptake of Nile tilapia, therefore exacerbating its effects in the brain, especially those effects related to the aggressive behavior of this fish, since DA is a neurotransmitter directly related to the modulation of this type of behavior in male tilapia.

Aggressive interaction is an important factor for the establishment of the dominance hierarchy in cichlid fish, ensuring access to limited resources [45,58,59]. Therefore, changes in aggressive behavior due to presence of toxic compounds may lead the organism to the inability to maintain its territory and to ensure adequate conditions for survival such as access to food and shelter [60] and reproduction [61]. As predicted in our hypothesis, our results showed that the highest MPH concentration tested caused a significant increase in the aggressiveness of male tilapia. This increased aggressiveness may be related to possible increase in the residence time of catecholamine, such as DA, in the synaptic clefts of the nervous system, as a function of the MPH-mediated blockade of its reuptake by DAT. In a study with female *Poecilia*

reticulata, authors have also suggested that DA levels had an influence on the exploratory behavior of these animals after acute exposure to 25 $\mu g.L^{-1}$ of MPH [26].

Despite the methods used in our study did not allow to distinguish between intra and extra-cellular concentrations of DA in the brain, the global quantification of DA levels could give a general perception about the modulation of concentrations of this neurotransmitter in the tissue. Contrary to our expectations, fish exposed to 100 $ng.L^{-1}$ of MPH presented significant lower DA levels than animals from the control group. In view of this unexpected result, we suggest that this decrease may be a long-term compensatory response of the fish brain to an initial increase in DA levels in the synaptic clefts due to MPH exposure. It is known that an elevation in DA levels can act on presynaptic D2 receptors that modulate both the synthesis and release of DA [62,63]. Therefore, it could be supposed that at first (short-term response), MPH would cause a significant increase of DA levels in synaptic clefts and, in order to compensate for this short-term effect, the animals began to synthesize less dopamine.

However, transcript levels of *TH*, the key enzyme in DA synthesis [64], remained unchanged after MPH exposure, suggesting that there was no change in the rate of DA production after five days of MPH exposure, for the tested concentrations. Nevertheless, it is important to note that the absence of changes in *TH* transcript levels does not necessarily reflect the absence of changes in protein levels and enzymatic activity of the protein (not evaluated in this study), which could have undergone some modulation leading to decreases of DA synthesis. Also, it is important mentioning that DA synthesis involves two steps, the first being the conversion of tyrosine into DOPA by TH, and the second, the conversion of DOPA in DA by DOPA decarboxylase, whose activity could also be affected in the animals exposed to MPH.

It is important to mention that DA is a substrate for NE synthesis, therefore possible negative modulations in pathways of DA synthesis with concomitant increase in synthesis pathways of NE from available DA could also support the decrease in DA levels observed in the MPH exposed fish. Further, it is also possible to suggest that the decrease in brain levels of DA may be related to its increased degradation, which in the mammalian brain is mediated by catechol-O-methyltransferase (COMT) and monoamine oxidase A (MAO-A) [31]. However, our results focused only in transcript levels of *TH*, which is not sufficient to explain the reduction in DA levels observed in fish exposed to higher MPH concentration. Thus, more studies are needed for a better elucidation of this effect.

Among the modulation mechanisms of dopamine-mediated aggressiveness is its involvement in the regulation of testosteroneproduction in males. Several studies have shown that increases in testosterone concentrations in fish lead to increase in aggressive interactions

[65–69]. In order to increase testosterone biosynthesis, DA stimulates the secretion of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus, which stimulates the pituitary to secrete luteinizing hormone, which then stimulates the testes to produce T [70,71]. Thus, it has been demonstrated that increases in DA levels are related to increases in T concentrations in animals, which would lead to an increase in aggressiveness. In a previous study, we observed that decreases in brain DA and plasmatic T in Nile tilapia, caused by exposure to the herbicide diuron and its biodegradation metabolites, resulted in significant reduction in the aggressiveness of the animals [32]. On the other hand, in the present study, the decrease in DA levels was not accompanied by similar changes in T levels, which not presented significant changes between the experimental groups. Therefore, the increase in aggressiveness caused by MPH exposition does not seem to be related to alterations in T levels.

It is also interesting to note that, despite the decrease in DA levels, no variations were observed in any dopamine genes analyzed, suggesting that changes in DA levels do not interfere in the expression of these receptors and transporter, although levels of the respective proteins were not evaluated in this study. Similarly, Amodeo et al. [72] also did not observe alterations in transcript levels of *D1* and *D2* receptors in rodents after MPH exposure, despite they observed increases in transcript levels of *D3* receptor, which was not evaluated in the present work.

Another hypothesis to explain the MPH effects in increase of the aggressiveness of tilapias would be a direct interaction of MPH with adrenergic receptors, as demonstrated in several other studies [30,73]. Andrews and Lavin [73], for example, demonstrated that MPH causes cortical excitation of the brain through direct activation of α-adrenergic receptors.

Another important modulator of the aggressive behavior is 5-HT. It is known that increases of 5HT in the brain are related to the reduction of aggressiveness in fish[40,74]. In contrary, decreases in 5-HT levels, as observed in Nile tilapia exposed to MPH, has the inverse effect, which could explain the increase in aggressiveness in these animals. Mechanisms that caused such 5-HT depletion in fish remains to be further elucidated.

In contrast to our results, *Danio rerio* embryos exposed for 5 days to 50 $mg.L^{-1}$ of MPH caused an increase in DA, 5-HT and NE levels, whereas behavioral dysfunctions such as deficit in escape response occurred in these animals only after long-term exposure (30 days) [24]. In contrary, we observed lower DA and 5-HT levels after 5 days of MPH exposure, probably due to the concentration used, which were not sufficient to promote an increase in neurotransmitters levels. In this context, one interesting hypothesis to explain the increase of aggressive interactions observed in MPH-exposed Nile tilapia is related to the involvement of 5HT and

DA on the modulation of fear emotions and anxiety, respectivelly. In mammals, the amygdala is densely innervated by fibers releasing 5HT, which arise from the midbrain raphe nuclei [75,76]. The 5HT system has long been implicated in the regulation of fear emotions[77,78]. On the other hand, it has been suggested that reduced DA function is associated with increased anxiety [79], and aversive emotions [80]. Therefore, decreased 5HT and DA would reduce fear sensations but increase anxiety and aversive emotions, turning fish more audacious and aggressive.

Finally, we checked the transcript levels and enzymatic activity of carboxylesterase, considering that MPH is metabolized by this enzyme in mammals, more specifically, by the *CES1A1* isoform [23]. The activity and expression of *CES1* isoform can be regulated by several factors such as polymorphisms and age [81–84] or environmental factors such as exposure to pollutants and lipophilic drugs [85]. Analogous genes for this isoform were not described for fish in the scientific literature and, therefore, two sequences avaliable in GeneBank for Nile tilapia were randomly selected for analysis, carboxylesterase 2 and 3. The initial proposal was to investigate if MP exposure could induce transcription and/or carboxylesterase activity in the brain, in order to metabolize MP. Nonetheless, our results showed that exposure to MPH at both concentrations did not cause changes in CbE activity or in *CES 2* transcript levels. On the other hand, unexpectedly, MP exposure resulted in a decrease in transcript levels of *CES 3*. In general, the specific physiological functions of *CES 3* in fish are not totally known, but it is known that in humans the *CES 3* are responsible for the hydrolysis of drugs containing ester and amide bonds, such as MPH, and also by hydrolysis of drugs such as cocaine and heroin [86]. Considering that MPH has an ester bond, it is possible that the *CbE 3* may have some affinity for the MPH, but the mechanisms that would lead to a decrease in the transcription of the gene of this enzyme remain to be clarified [87]. Thus, the decrease in transcription of this gene in tilapias due to exposure to MPH could result in negative effects on the metabolism of these endogenous substances in fish.

5. Conclusion

We conclude that although MPH increased the aggressiveness of animals, this effect seems not to be directly related to the dopaminergic system of the animals, given the decrease in DA concentrations and the absence of alterations in transcript levels of dopamine receptors and *TH*. It was also not related to changes in plasmatic T levels. We suggest that increased aggressiveness may be a consequence of a significant decrease in 5-HT and DA levels in the brain, by decreasing fear and increasing anxiety and aversive emotions. It should be also

emphasized that the fish were exposed for five days to MPH without water change and MPH replacement (single dose exposure). As commented previously, the behavioral effects of MPH in mammals peak 1 to 2 hours after administration and tend to dissipate in 3 to 5 hours. Thus, it should be considered that the lack of MPH effects on dopaminergic system of Nile tilapia after five days could probably be a consequence of MPH pharmacokinetics on fish, which lasts only few hours to promote its effects, in contrast to the five exposure days used in this study. Nevertheless, the effect on the aggressive behavior remained active, maybe due to a prolonged period needed by the fish brain to recuperate from an initial MPH effects.

References

[1] V. Calisto, V.I. Esteves, Psychiatric pharmaceuticals in the environment, Chemosphere. 77 (2009) 1257–1274. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.021.

[2] C.D. Metcalfe, S. Chu, C. Judt, H. Li, K.D. Oakes, M.R. Servos, D.M. Andrews, Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed, Environ. Toxicol. Chem. 29 (2010) 79–89. doi:10.1002/etc.27.

[3] J. Klaminder, T. Brodin, A. Sundelin, N.J. Anderson, J. Fahlman, M. Jonsson, J. Fick, Long-Term Persistence of an Anxiolytic Drug (Oxazepam) in a Large Freshwater Lake, Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 10406–10412. doi:10.1021/acs.est.5b01968.

[4] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review, Sci. Total Environ. 429 (2012) 123–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.028.

[5] J. Fick, T. Brodin, M. Heynen, J. Klaminder, M. Jonsson, K. Grabicova, T. Randak, R. Grabic, V. Kodes, J. Slobodnik, A. Sweetman, M. Earnshaw, A. Barra Caracciolo, T. Lettieri, R. Loos, Screening of benzodiazepines in thirty European rivers, Chemosphere. 176 (2017) 324–332. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.126.

[6] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhøft, S.E. Jørgensen, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, Chemosphere. 36 (1998) 357–393. doi:10.1016/S0045-6535(97)00354-8.

[7] V. Andreu, P. Vazquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 1329–1339. doi:10.1007/s00216-009-2635-x.

[8] F. Chen, G.-G. Ying, L.-X. Kong, L. Wang, J.-L. Zhao, L.-J. Zhou, L.-J. Zhang, Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China, Environ. Pollut. 159 (2011) 1490–1498. doi:10.1016/J.ENVPOL.2011.03.016.

[9] B.A. Faraj, Z.H. Israili, J.M. Perel, M.L. Jenkins, S.G. Holtzman, S.A. Cucinell, P.G.

Dayton, Metabolism and disposition of methylphenidate-14c: studies in man and animals, J. Pharmacol. Exp. Ther. 191 (1974).

[10] W. Wargin, K. Patrick, C. Kilts, C. Gualtieri, K. Ellington, R. a. Mueller, G. Kreamer, G.R. Breese, Pharmacokinetics of Methyiphenidate, J. Pharmacol. Exp. Ther. 226 (1983) 382–386.

[11] H.C. Endres, C. Kabaselle, C.D. Bertol, L.G. Rossato-Grando, J.G. da Rosa, H.H. Barcellos, L.J. Gil Barcellos, H.H. Barcellos, L.J. Gil Barcellos, L.J. Gil Barcellos, First evidence that waterborne methylphenidate alters endocrine and behavioral stress responses in zebrafish, Neurosci. Lett. 650 (2017) 114–117. doi:10.1016/j.neulet.2017.04.039.

[12] M. Letzel, K. Weiss, W. Schüssler, M. Sengl, Occurrence and fate of the human pharmaceutical metabolite ritalinic acid in the aquatic system, Chemosphere. 81 (2010) 1416–1422. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.018.

[13] D.A. Burgard, R. Fuller, B. Becker, R. Ferrell, M.J. Dinglasan-Panlilio, Potential trends in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) drug use on a college campus: Wastewater analysis of amphetamine and ritalinic acid, Sci. Total Environ. 450–451 (2013) 242–249. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.020.

[14] S.G. Amara, M.J. Kuhar, Neurotransmitter Transporters: Recent Progress, Annu. Rev. Neurosci. 16 (1993) 73–93. doi:10.1146/annurev.ne.16.030193.000445.

[15] R.B. Rothman, M.H. Baumann, Monoamine transporters and psychostimulant drugs, Eur. J. Pharmacol. 479 (2003) 23–40. doi:10.1016/J.EJPHAR.2003.08.054.

[16] D.C.E.S. Gene, K.A. Johnson, E. Barry, D. Lambert, M. Fitzgerald, F. Mcnicholas, A. Kirley, M. Gill, M.A. Bellgrove, Z. Hawi, Methylphenidate Side Effect Profile Is Influenced by Genetic Variation in the Attention-Deficit / Hyperactivity, 23 (2013) 655–664. doi:10.1089/cap.2013.0032.

[17] N.D. Volkow, G.-J. Wang, J.S. Fowler, S.J. Gatley, J. Logan, Y.-S. Ding, R. Hitzemann, N. Pappas, Dopamine Transporter Occupancies in the Human Brain Induced by Therapeutic Doses of Oral Methylphenidate, Am. J. Psychiatry. 155 (1998) 1325–1331. doi:10.1176/ajp.155.10.1325.

[18] E.J. Dommett, E.L. Henderson, M.S. Westwell, S.A. Greenfield, Methylphenidate amplifies long-term plasticity in the hippocampus via noradrenergic mechanisms, Learn. Mem. 15 (2008) 580–586. doi:10.1101/lm.1092608.

[19] J.A. Bethancourt, Z.Z. Camarena, G.B. Britton, Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats, Behav. Brain Res. 202 (2009) 50–57. doi:10.1016/j.bbr.2009.03.015.

[20] B.E. Schmeichel, C.W. Berridge, Wake-promoting actions of noradrenergic α_1 - and β-receptors within the lateral hypothalamic area, Eur. J. Neurosci. 37 (2013) 891–900. doi:10.1111/ejn.12084.

[21] C.M. Hysek, L.D. Simmler, N. Schillinger, N. Meyer, Y. Schmid, M. Donzelli, E. Grouzmann, M.E. Liechti, Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of

methylphenidate and MDMA administered alone or in combination, (2014) 371–381. doi:10.1017/S1461145713001132.

[22] K.S. Patrick, R.W. Caldwell, R.M. Ferris, G.R. Breese, Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate., J. Pharmacol. Exp. Ther. 241 (1987) 152–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3572779

[23] Z. Sun, Methylphenidate Is Stereoselectively Hydrolyzed by Human Carboxylesterase CES1A1, J. Pharmacol. Exp. Ther. 310 (2004) 469–476. doi:10.1124/jpet.104.067116.

[24] E.D. Levin, D. Sledge, S. Roach, A. Petro, S. Donerly, E. Linney, Persistent behavioral impairment caused by embryonic methylphenidate exposure in zebrafish, Neurotoxicol. Teratol. 33 (2011) 668–673. doi:10.1016/j.ntt.2011.06.004.

[25] D.D. Kristófersdóttir, The short-term effect of Methylphenidate on swim speed in zebrafish larvae, (2014).

[26] A.R. De Serrano, C. Fong, F.H. Rodd, Effects of methylphenidate on responses to novelty in a teleost fish (Poecilia reticulata), Behav. Brain Res. 302 (2016) 53–59. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.021.

[27] E.A. Daubert, B.G. Condron, Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry, Trends Neurosci. 33 (2010) 424–434. doi:10.1016/j.tins.2010.05.005.

[28] P.S. Goldman-Rakic, The cortical dopamine system: role in memory and cognition., Adv. Pharmacol. 42 (1998) 707–11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9327997

[29] B. Levavi-sivan, J. Aizen, A. Avitan, Cloning , characterization and expression of the D 2 dopamine receptor from the tilapia pituitary, 236 (2005) 17–30. doi:10.1016/j.mce.2005.03.010.

[30] N.J. Gamo, M. Wang, A.F.T. Arnsten, Methylphenidate and atomoxetine enhance prefrontal function through α2-adrenergic and dopamine D1receptors, J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 49 (2010) 1011–1023. doi:10.1016/j.jaac.2010.06.015.

[31] R.M.M. De Almeida, P.F. Ferrari, S. Parmigiani, K.A. Miczek, Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA, Eur. J. Pharmacol. 526 (2005) 51–64. doi:10.1016/j.ejphar.2005.10.004.

[32] C.N.P. Boscolo, P. Boscolo, T. Scremin, B. Pereira, P. Leocadia, R. Dourado, D. Schlenk, Chemosphere Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (Oreochromis niloticus), 191 (2018) 832–838. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.009.

[33] D. E. Golan, Princípios de Farmacologia - a Base Fisiopatológica da Farmacoterapia - 2ª Ed. Guanabara Koogan (2009)

[34] M. Tiberi, K.R. Jarvie, C. Silvia, P. Falardeau, J.A. Gingrich, N. Godinot, L. Bertrand, T.L. Yang-Feng, R.T. Fremeau, M.G. Caron, 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., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991) 7491–5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831904

[35] J.-M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov, The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors, Pharmacol. Rev. 63 (2011) 182–217. doi:10.1124/pr.110.002642.

[36] J.W. Tidey, K.A. Miczek, Heightened aggressive behavior during morphine withdrawal: effects of d-amphetamine., Psychopharmacology (Berl). 107 (1992) 297–302. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1615129

[37] A. Takahashi, K.A. Miczek, Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents., Curr. Top. Behav. Neurosci. 17 (2014) 3–44. doi:10.1007/7854_2013_263.

[38] R. V. Parsey, Serotonin Receptor Imaging: Clinically Useful?, J. Nucl. Med. 51 (2010) 1495–1498. doi:10.2967/jnumed.109.068908.

[39] D. Kiser, B. SteemerS, I. Branchi, J.R. Homberg, The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour, Neurosci. Biobehav. Rev. 36 (2012) 786–798. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.12.009.

[40] R.J. Nelson, S. Chiavegatto, Molecular basis of aggression., Trends Neurosci. 24 (2001) 713–9. doi:10.1016/S0166-2236(00)01996-2.

[41] B. Olivier, R. van Oorschot, 5-HT1B receptors and aggression: A review, Eur. J. Pharmacol. 526 (2005) 207–217. doi:10.1016/j.ejphar.2005.09.066.

[42] M. Östman, J. Fick, E. Näsström, R.H. Lindberg, Science of the Total Environment A snapshot of illicit drug use in Sweden acquired through sewage water analysis, Sci. Total Environ. 472 (2014) 862–871. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.081.

[43] G.L. Volpato, R.E. Barreto, Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia., Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol. 34 (2001) 1041–5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11471044

[44] R.E. Barreto, G.L. Volpato, C. de B. Faturi, P.C. Giaquinto, E.G. de Freitas, M.F. de Castilho, Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (Oreochromis niloticus), Mar. Freshw. Behav. Physiol. 42 (2009) 109–118. doi:10.1080/10236240902850392.

[45] C.N.P. Boscolo, R.N. Morais, E. Gonçalves-de-Freitas, Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain, Appl. Anim. Behav. Sci. 135 (2011) 154–159. doi:10.1016/j.applanim.2011.10.003.

[46] E.S. Brown, F.P. Varghese, B.S. McEwen, Association of depression with medical illness: Does cortisol play a role?, Biol. Psychiatry. 55 (2004) 1–9. doi:10.1016/S0006-3223(03)00473-6.

[47] G. Egidio, D. Benedetto, D. Fico, A. Pennetta, C. Malitesta, G. Nicolardi, D. Domenico, F. De Nuccio, V. La, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection, J. Pharm. Biomed. Anal. 98 (2014) 266–270. doi:10.1016/j.jpba.2014.05.039.

[48] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity., Biochem. Pharmacol. 7 (1961) 88–95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518

[49] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., Anal. Biochem. 72 (1976) 248–54. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051

[50] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, Nat. Protoc. 3 (2008) 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.

[51] G.P. Quinn, M.J. Keough, P.S. Petraitis, G.P. Quinn, M.J. Keough, Experimental design and data analysis for biologists, 2002. doi:10.1016/S0022-0981(02)00278-2.

[52] J.H. McDonald, Handbook of Biolological Statistics. 3rd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland (2014)

[53] S.J. Gatley, D. Pan, R. Chen, G. Chaturvedi, Y.S. Ding, Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters., Life Sci. 58 (1996) 231–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786705

[54] S.H. Dresel, M.P. Kung, X.F. Huang, K. Plössl, C. Hou, S.K. Meegalla, G. Patselas, M. Mu, J.R. Saffer, H.F. Kung, Simultaneous SPECT studies of pre- and postsynaptic dopamine binding sites in baboons., J. Nucl. Med. 40 (1999) 660–6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10210226

[55] M. Federici, R. Geracitano, G. Bernardi, N.B. Mercuri, Actions of methylphenidate on dopaminergic neurons of the ventral midbrain, Biol. Psychiatry. 57 (2005) 361–365. doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.030.

[56] J.S. Markowitz, C.L. DeVane, L.K. Pestreich, K.S. Patrick, R. Muniz, A Comprehensive *In Vitro* Screening of *d-*, *l-* , and *dl-threo* -Methylphenidate: An Exploratory Study, J. Child Adolesc. Psychopharmacol. 16 (2006) 687–698. doi:10.1089/cap.2006.16.687.

[57] S. Nikolaus, C. Antke, M. Beu, K. Kley, R. Larisch, A. Wirrwar, H.-W. M??ller, In-vivo quantification of dose-dependent dopamine transporter blockade in the rat striatum with small animal SPECT, Nucl. Med. Commun. 28 (2007) 207–213. doi:10.1097/MNM.0b013e328014a0df.

[58] M. Enquist, S. Jakobsson, Decision Making and Assessment in the Fighting Behaviour of Nannacara anomala (Cichlidae, Pisces), Ethology. 72 (2010) 143–153. doi:10.1111/j.1439-0310.1986.tb00614.x.

[59] L. Turner, Diazinon Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead November 29,2002, (2002).

[60] R. Triebskorn, H.-R. Köhler, W. Honnen, M. Schramm, S.M. Adams, E.F. Müller, 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?, J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover. 6 (1997) 57–73. doi:10.1023/A:1008224301117.

[61] T. S. B. Pereira, C. N. P. Boscolo, D. G.H. Silva , S. R. Batlouni, D. Schlenk, E. A. Almeida, Anti-androgenic activities of diuron and its metabolites in male Nile tilapia (Oreochromis niloticus), Aquat. Toxicol. 164 (2015) 10–15. doi:10.1016/j.aquatox.2015.04.013.

[62] M.D. Davis, T.G. Heffner, L.W. Cooke, Dopamine Agonist-Induced Inhibition of

Neurotransmitter Release from the Awake Squirrel Monkey Putamen as Measured by Microdialysis, J. Neurochem. 68 (1997) 659–666. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.68020659.x.

[63] P. Seeman, B.K. Madras, Anti-hyperactivity medication: Methylphenidate and amphetamine, Mol. Psychiatry. 3 (1998) 386–396. doi:10.1038/sj.mp.4000421.

[64] R.W. Morris, S.J. Fung, D.A. Rothmond, B. Richards, S. Ward, P.L. Noble, R.A. Woodward, C.S. Weickert, J.T. Winslow, The effect of gonadectomy on prepulse inhibition and fear-potentiated startle in adolescent rhesus macaques, Psychoneuroendocrinology. 35 (2010) 896–905. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.12.002.

[65] J.R. Cardwell, N.R. Liley, Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, Sparisoma viride (Scaridae), Horm. Behav. 25 (1991) 1–18. doi:10.1016/0018-506X(91)90035-G.

[66] N.W. Pankhurst, C.W. Barnett, Relationship of Population Density, Territorial Interaction and Plasma Levels of Gonadal Steroids in Spawning Male Demoiselles Chromis dispilus (Pisces: Pomacentridae), Gen. Comp. Endocrinol. 90 (1993) 168–176. doi:10.1006/GCEN.1993.1071.

[67] K. Hirschenhauser, R.F. Oliveira, Social modulation of androgens in male vertebrates: meta-analyses of the challenge hypothesis, Anim. Behav. 71 (2006) 265–277. doi:10.1016/J.ANBEHAV.2005.04.014.

[68] V.N. Parikh, T.S. Clement, R.D. Fernald, Androgen level and male social status in the African cichlid, Astatotilapia burtoni, Behav. Brain Res. 166 (2006) 291–295. doi:10.1016/J.BBR.2005.07.011.

[69] R.M. Alcazar, L. Becker, A.T. Hilliard, K.R. Kent, R.D. Fernald, Two types of dominant male cichlid fish: behavioral and hormonal characteristics, (2016). doi:10.1242/bio.017640.

[70] S.G. Siris, E.S. Siris, D.P. van Kammen, J.P. Docherty, P.E. Alexander, W.E. Bunney, Effects of dopamine blockade on gonadotropins and testosterone in men, Am. J. Psychiatry. 137 (1980) 211–214. doi:10.1176/ajp.137.2.211.

[71] S. Li, G. Pelletier, Role of dopamine in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the male rat brain as studied by in situ hybridization, Endocrinology. 131 (1992) 395–399. doi:10.1210/en.131.1.395.

[72] L.R. Amodeo, E. Jacobs-Brichford, M.S. McMurray, J.D. Roitman, Acute and long-term effects of adolescent methylphenidate on decision-making and dopamine receptor mRNA expression in the orbitofrontal cortex, Behav. Brain Res. 324 (2017) 100–108. doi:10.1016/j.bbr.2017.02.019.

[73] G.D. Andrews, A. Lavin, Methylphenidate Increases Cortical Excitability via Activation of Alpha-2 Noradrenergic Receptors, Neuropsychopharmacology. 31 (2006) 594–601. doi:10.1038/sj.npp.1300818.

[74] N. Duque-Wilckens, B.C. Trainor, Behavioral Neuroendocrinology of Female Aggression, Oxford University Press, 2017. doi:10.1093/acrefore/9780190264086.013.11.

[75] A. Parent, L. Descarries, A. Beaudet, Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3h]5-hydroxytryptamine, Neuroscience. 6 (1981) 115–138. doi:10.1016/0306-4522(81)90050-6.

[76] M. Bocchio, S.B. McHugh, D.M. Bannerman, T. Sharp, M. Capogna, Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle., Front. Neural Circuits. 10 (2016) 24. doi:10.3389/fncir.2016.00024.

[77] J.F.W. Deakin, F.G. Graeff, 5-HT and mechanisms of defence, J. Psychopharmacol. 5 (1991) 305–315. doi:10.1177/026988119100500414.

[78] C.A. Lowry, P.L. Johnson, A. Hay-Schmidt, J. Mikkelsen, A. Shekhar, Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems, Stress. 8 (2005) 233–246. doi:10.1080/10253890500492787.

[79] S. Robinson, Q. Li, A. DeChant, M.L. Cohen, Neonatal loss of γ–aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury, J. Neurosurg. Pediatr. 104 (2006) 396–408. doi:10.3171/ped.2006.104.6.396.

[80] S. Ikemoto, C. Yang, A. Tan, Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry, Behav. Brain Res. 290 (2015) 17–31. doi:10.1016/J.BBR.2015.04.018.

[81] K.S. Patrick, A.B. Straughn, R.R. Minhinnett, S.D. Yeatts, A.E. Herrin, C.L. DeVane, R. Malcolm, G.C. Janis, J.S. Markowitz, Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics., Clin. Pharmacol. Ther. 81 (2007) 346–53. doi:10.1038/sj.clpt.6100082.

[82] H.-J. Zhu, K.S. Patrick, H.-J. Yuan, J.-S. Wang, J.L. Donovan, C.L. DeVane, R. Malcolm, J.A. Johnson, G.L. Youngblood, D.H. Sweet, T.Y. Langaee, J.S. Markowitz, Two CES1 Gene Mutations Lead to Dysfunctional Carboxylesterase 1 Activity in Man: Clinical Significance and Molecular Basis, Am. J. Hum. Genet. 82 (2008) 1241–1248. doi:10.1016/j.ajhg.2008.04.015.

[83] H.-J. Zhu, D.I. Appel, Y. Jiang, J.S. Markowitz, Age- and Sex-Related Expression and Activity of Carboxylesterase 1 and 2 in Mouse and Human Liver, Drug Metab. Dispos. 37 (2009) 1819–1825. doi:10.1124/dmd.109.028209.

[84] D. Yang, R.E. Pearce, X. Wang, R. Gaedigk, Y.-J.Y. Wan, B. Yan, Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: Ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin, Biochem. Pharmacol. 77 (2009) 238–247. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.005.

[85] M. Hosokawa, T. Endo, M. Fujisawa, S. Hara, N. Iwata, Y. Sato, T. Satoh, Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes., Drug Metab. Dispos. 23 (1995) 1022–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654188

[86] S.P. Sanghani, P.C. Sanghani, M. a Schiel, W.F. Bosron, Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3., Protein Pept. Lett. 16 (2009) 1207–14. doi:10.2174/092986609789071324.

[87] M. Hosokawa, T. Furihata, Y. Yaginuma, N. Yamamoto, N. Watanabe, E. Tsukada, Y.

Ohhata, K. Kobayashi, T. Satoh, K. Chiba, Structural Organization and Characterization of the Regulatory Element of the Human Carboxylesterase (CES1A1 and CES1A2) genes, Drug Metab. Pharmacokinet. 23 (2008) 73–84. doi:10.2133/DMPK.23.73.

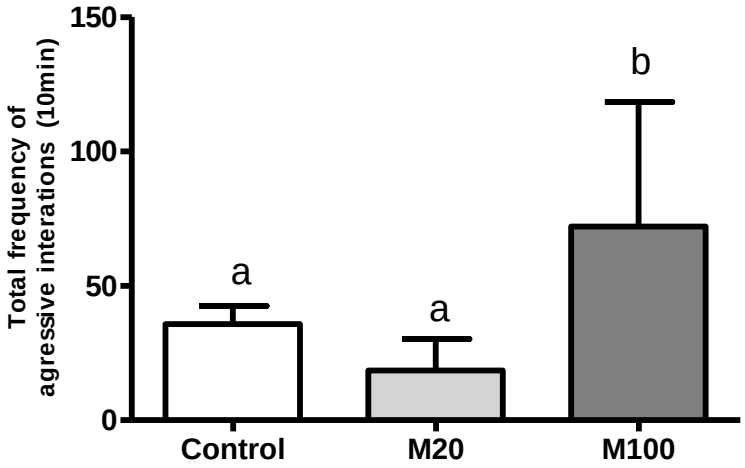


Fig 1: Total frequency of displays and attacks of *O. niloticus* males exposed to 0 (control), 20 (M20), and 100 (M100) $ng.L^{-1}$ of methylphenidate for 5 days. Different letters indicate statistical difference between the groups (GLM followed by FISHER´s test; $p<0.05$). Values were represented by mean ± 95% confidence intervals.

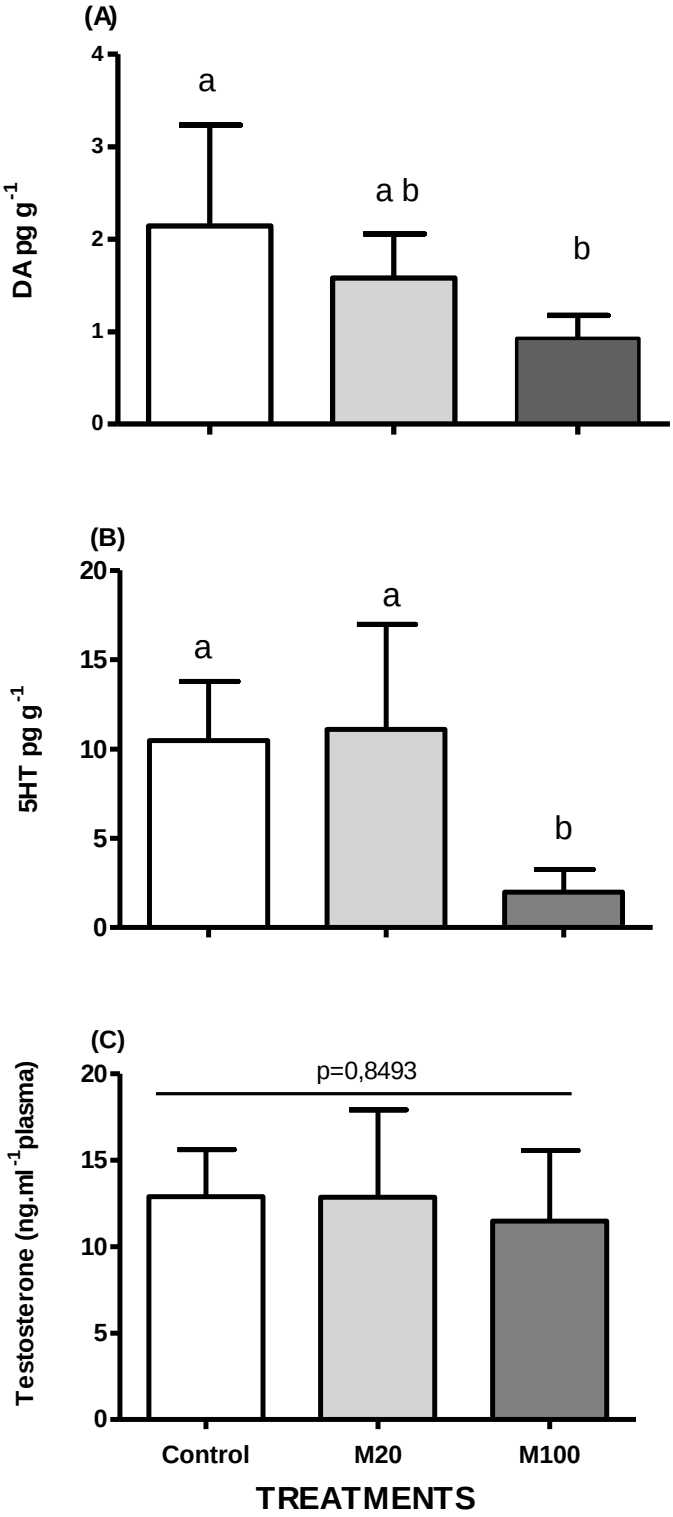


Fig. 2: Level of dopamine (A) and serotonin (B) in the brain, and plasma concentration of testosterone (C) of *O. niloticus* males exposed to 0 (control), 20 (M20), and 100 (M100) ng.L^{-1} of methylphenidate for 5 days. Different letters indicate statistical difference between the groups (GLM followed by FISHER´s test; $p<0.05$). Values were represented by mean ± 95% confidence intervals.

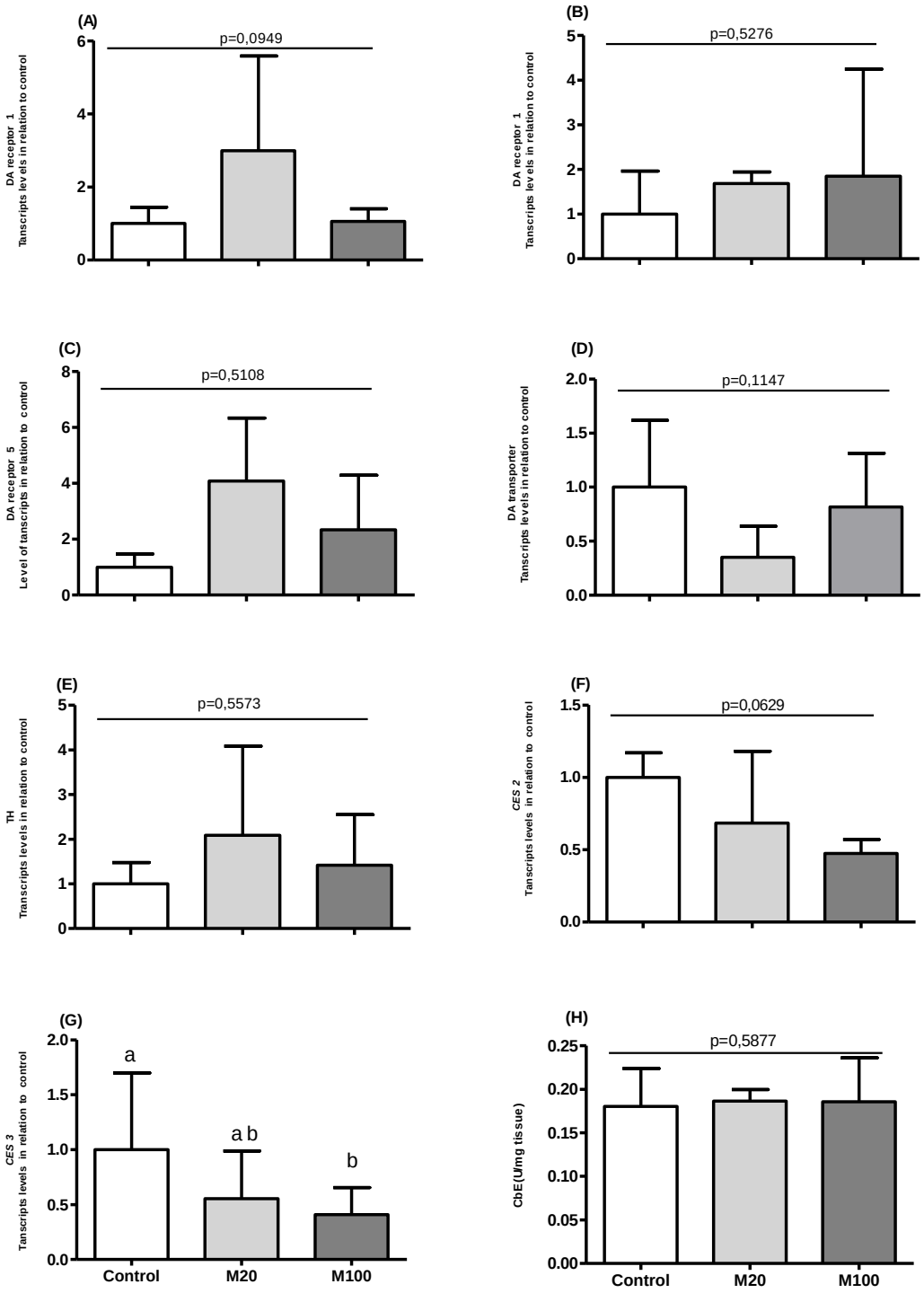


Fig 3: Transcript levels of genes of dopamine receptor 1 (A), dopamine receptor 2 (B), dopamine receptor 5 (C), dopamine transporter (D), tirosyne hidroxylase (E), carboxylesterase 2 (F), carboxylesterase 3 (G) and enzymatic activity of carboxylesterase (H) of *O. niloticus* exposed to 0 (control), 20 (M20) and 100 (M100) $ng.L^{-1}$ of methylphenidate for 5 days. Different letters indicate statistical difference between the groups (GLM followed by FISHER´s test; $p<0.05$). Values for carboxylesterase activity were represented by mean ± 95% confidence interval and for transcript levels of genes as mean fold increase related to the control group ± 95% confidence intervals.

Capítulo 2

Avaliação de biomarcadores bioquímicos em tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)* expostas ao metilfenidato

Isabela Gertrudes Batalhão[1], Daína de Lima[2], Camila Nomura Pereira Boscolo[3,] Danilo Grunig Humberto Silva[1], Eduardo Alves de Almeida[4]

[1]*UNESP - Sao Paulo State University, Department of Chemistry and Environmental Sciences, São Paulo, Brazil*
[2]*UFSC- Federal University of Santa Catarina, Department of Biochemistry, Florianópolis, SP, Brazil*
[3]*UNIRP- University Center of Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil*
[4]*FURB Fundação Universidade Regional de Blumenau, Department of Natural Sciences, Blumenau, SC, Brazil*

*Correspondent author: edualves1976@hotmail.com

Abstract

The wastewater treatment plants (WWTP) are not designed to completely remove pharmaceuticals from effluents, which its final destination is surface water. Methylphenidate (MF, known as Ritalin) and its metabolite, ritalinic acid, have already been found in the environment at levels of $ng.L^{-1}$, but there are few studies that report their damage to the ecosystem and non-target organisms. In this work, we evaluated the effects that MF, in environmental concentrations, can cause in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), through the antioxidant defense system, biotransformation enzymes, levels of lipid peroxidation and esterase activity. Male fish were exposed to 0, 20, 100 and 200 $ng.L^{-1}$ of MF for 5 days. All the exposed groups presented concentration-dependent inhibitory effect on the gills in both catalase (CAT) and glutathione peroxidase activity (GPx). No changes were observed in the activity of ethoxyureorufin-O-deethylase (EROD) and 7-benzyloxysorufine O-desalkylase (BROD), in tilapia liver and gills. There were also no differences in the activity of acetylcholinesterase (AChE) in fish liver. However, in gills there was a concentration-dependent decrease in AChE activity in the groups exposed to 100 and 200 $ng.L^{-1}$ of MF On the other hand, the activity of the carboxylesterase (CbE) increased in the groups exposed to 20 and 200 $ng.L^{-1}$ of MF, compared to the control group. The levels of lipid peroxidation were lower in the liver of the animals of all exposed groups than the control group; no changes were observed in the gills. Our results show that the effect of MF was more expressive in the gills compared to the liver of exposed fish, and evidenced that the MF could negatively affect the antioxidant capacity of the fish, despite it did not cause an increase in lipid peroxidation.

Key words: *Oreochromis niloticus*, methylphenidate, antioxidant enzymes, biotransformation enzymes, lipid peroxidation

1. Introdução

Entre os anos de 1960 e 1970, foram publicados os primeiros estudos que constataram sinais da remoção incompleta de alguns produtos farmacêuticos e seus metabólitos pelas estações de tratamento de águas residuais (ETAR), com descarte subsequente no ambiente aquático (HIGNITE; AZARNOFF, 1977). No entanto, ainda nos dias atuais, as ETAR não são projetadas para remover completamente essa classe de contaminantes que têm como destino final as águas superficiais (LOLIĆ et al., 2015; PAL et al., 2010; PETROVIC et al., 2002; TERNES; BONERZ; SCHMIDT, 2001).

Sabe-se que toneladas de fármacos são produzidas anualmente para serem consumidos por seres humanos e animais (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; KOSTICH et al., 2010). Uma vez ingeridos, apenas uma fração é metabolizada pelo organismo enquanto o restante é excretado, seja como metabólito ou na sua forma inalterada (BUNCH; BERNOT, 2011). Porém, de uma maneira diferente de alguns poluentes convencionais (como pesticidas, detergentes, combustíveis, entre outros), os medicamentos são continuamente ministrados em níveis relativamente baixos, e quando presentes no ambiente aquático, podem dar origem a toxicidade mesmo sem altas taxas de persistência no ambiente (Halling-Sørensen et al., 1998; Glassmeyer et al., 2005) . Estudos mostram que diferentes classes de fármacos podem ser encontradas no ambiente aquático na faixa de $ng.L^{-1}$ a $\mu g.L^{-1}$ (ANDREU et al., 2016; CHEN et al., 2011; CORTEZ et al., 2018)

O metilfenidato (MF, conhecido como Ritalina) é um psicoestimulante, prescrito há mais de 50 anos para o tratamento efetivo de crianças diagnosticadas com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (SWANSON; VOLKOW, 2002). O principal mecanismo de ação desse medicamento está envolvido com o bloqueio de transportadores de dopamina (DA), resultando no aumento desse neurotransmissor na fenda sináptica (CASTELLANOS et al., 1996; SOLANTO, 2002; VOLKOW et al., 2005) com subsequentes melhoras cognitivas no indivíduo. O MF e o seu metabólito, o ácido ritalínico já foram detectados em efluentes aquáticos, de acordo com pesquisa realizada por Letzel e colaboradores (2010) que analisaram águas residuais na Alemanha. O estudo mostrou que a concentração de ácido ritalínico estava na faixa de 50-170 $ng.L^{-1}$ nesse compartimento.

Os fármacos, quando absorvidos pelos organismos, passam por um processo de metabolização por enzimas específicas, que têm a função de biotransformar os compostos lipossolúveis em hidrossolúveis, de modo que seja mais fácil de serem excretados pela célula (LIVINGSTONE, 2001). Esse processo de detoxificação de compostos químicos possui duas

fases: na primeira ocorrem reações de oxidação, redução ou hidrólise do composto, na segunda acontecem as reações de conjugação (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Na fase I, as reações são catalisadas por enzimas como a 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) e a 7-benzilóxiresorufina *O*-desalquilase (BROD), que fazem parte do complexo multienzimático das monooxigenases do citocromo P450 (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Desta maneira, durante todo o processo de biotransformação, juntamente, com o aumento do consumo de oxigênio para produção de energia na mitocôndria para lidar com a intoxicação, pode ocorrer aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ((OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), elevando os níveis de lesões oxidativas às macromoléculas e gerando estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2005; DZUL-CAAMAL et al., 2014; SAKURAGUI et al., 2013; VIOQUE-FERNÁNDEZ; DE ALMEIDA; LÓPEZ-BAREA, 2007). Para proteger a célula contra os efeitos negativos do estresse oxidativo, a célula possui sistemas de defesa enzimático e não-enzimático que atuam interceptando e inativando as ERO, tais como as enzimas catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (LUSHCHAK, 2011).

Análises das esterases, acetilcolinesterases (AChE) e carboxilesterases (CbE) também tem sido ferramentas utilizadas para monitorar a presença de compostos neurotóxicos no ambiente aquático, assim como para determinar os efeitos em organismos não-alvo (FONTES et al., 2017; LIONETTO et al., 2013; NUNES, 2010). AChE está localizada nas membranas celulares de diversos tipos celulares, e é responsável pela hidrólise da acetilcolina, um éster liberado na fenda sináptica quando o impulso nervoso é transmitido de um neurônio a outro, que quando hidrolisado forma colina e ácido acético (Bainy et al., 2006; De Lima et al., 2013). A inibição da AChE, leva a hiperestimulação do sistema nervoso central (SNC) e periférico, devido a um acúmulo de acetilcolina na célula, resultando em efeitos neurotóxicos deletérios nos organismos, podendo causar até a morte dos mesmos (PEAKALL, 1992).

Em invertebrados e humanos a CbE desempenha um papel mais significativo no metabolismo, e subsequente detoxificação de muitos fármacos (GALLOWAY et al., 2002; POTTER; WADKINS, 2006). Para isso, as CbE catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos através da adição de água. As CbE são uma família multigênica de isoenzimas (CES1A1, CES2 e CES3), que variam de acordo com o tecido e o organismo estudado (HOSOKAWA et al., 1995; SATOH; HOSOKAWA, 1995). Sun e colaboradores (2004) ao estudarem o metabolismo do MF em fígado de humanos, observaram que apenas a CES1A1 tem uma alta eficiência catalítica frente ao MF. Porém em peixes, não existem dados na literatura científica sobre o metabolismo do MF.

Estudos sobre os efeitos do MF em concentrações ambientais em peixes são escassos na literatura científica. Endres e colaboradores (2017) demonstraram pela primeira vez que o MF em concentrações encontradas em efluentes domésticos causou alterações nas respostas neuroendócrinas na concentração de 0,1875 $\mu g.L^{-1}$, e comportamentais na concentração de 0,01875 $\mu g.L^{-1}$ em *Danio rerio*, após exposição aguda por 15 min ao fármaco. Levin et al. (2011) e Serrano et al. (2016), também observaram alterações comportamentais causadas pelo MF em *Danio rerio* e *Poecilia reticulata*, respectivamente. Porém não há relatos na literatura que avaliem marcadores bioquímicos como parâmetros de estresse oxidativo e atividade de enzimas de biotransformação em peixes após exposição ao MF. Não obstante, estudos com ratos observaram que o MF causou danos oxidativo no coração e cérebro desses animais (ANDREAZZA et al., 2007; CM et al., 2014; MARTINS et al., 2006).

Considerando a falta de tratamentos eficientes para a remoção dos fármacos e seus metabólitos, assim como o aumento do consumo do MF, é de grande relevância trabalhos que relatem possíveis danos causados no ecossistema e em organismos não-alvo devido à presença do MF no ambiente aquático. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar por meio do sistema de defesa antioxidante (CAT e GPx), enzimas de biotransformação (EROD e BROD), níveis de peroxidação lipídicas e atividade das esterases (AChE e CbE), o efeito que MF em concentrações ambientais, pode causar em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. Métodos

2.1. Animais e aclimatação

Machos adultos da espécie *O. niloticus* de tamanho e peso similar (12,9 + 1,2 cm; 61,4 + 18,2 g) foram obtidos junto ao centro de aquicultura da UNESP, São José do Rio Preto, Brasil. Os peixes foram aleatoriamente selecionados e aclimatados por 30 dias em tanques de 500 L (5 L por peixe), com aeração constante, na temperatura de 27°C e fotoperíodo 12C:12E ((BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixes (Guabi-Pirá/Brazil).

Este estudo foi realizado de acordo com os preceitos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA), UNESP, São José do Rio Preto-SP, Brasil, protocolo nº 109/2015.

2.2. Exposição ao metilfenidato

Após o período de aclimatação, os peixes foram divididos em quatro grupos de nove peixes (N=9) e foram individualmente acondicionados em aquários contendo 17 L de água sem

cloro. Os peixes foram expostos por cinco dias aos seguintes tratamentos: um grupo controle, sem adição de MF, e três grupos expostos às concentrações de 20, 100 e 200 $ng.L^{-1}$ de MF. Até onde sabemos, não há estudos relatando as concentrações de MF em ambientes aquáticos naturais. Assim, as concentrações de MF utilizadas neste estudo foram escolhidas com base em um estudo realizado em estações de tratamento de efluentes na Suécia, que estimaram a carga de MF per capita como sendo de 1 a 25 $\mu g.dia^{-1}$ (ÖSTMAN et al., 2014), apesar da concentração real em efluentes não ter sido avaliada. Em outro estudo, Letzel (2010) e colaboradores relataram que a concentração de ácido ritalínico, principal metabólito do MF, nos efluentes de águas residuais na Alemanha estava na faixa de 50-170 $ng.L^{-1}$, o que corresponde a uma carga per capita média de 17,7 $\mu g.dia^{-1}$. Considerando as cargas per capita semelhantes de MF na Suécia e de ácido ritalínico na Alemanha, estimamos que os níveis de MF em efluentes alemães seriam semelhantes à concentração de ácido ritalínico em efluentes na Suécia. Deve-se considerar também que no Brasil (207,7 milhões de habitantes), semelhante a outros países, cerca de 50% dos esgotos não recebem nenhum tipo de tratamento, sendo diretamente descartados nos ambientes aquáticos. Assim, apesar da ausência de dados sobre concentrações de MF no ambiente aquático, selecionamos concentrações que representariam, no mínimo, um cenário plausível de contaminação por MF.

O metilfenidato (> 98% de pureza, Sigma-Aldrich, CAS: 1219804-02-0) foi dissolvido em acetona (> 98% de pureza, Sigma-Aldrich, CAS 67-64-1) e adicionado aos aquários de exposição para atingir concentrações selecionadas em uma concentração final de 0,001% (v/v) de acetona. No intuito de minimizar os efeitos do solvente, o grupo controle também foi exposto ao mesmo volume de acetona.

Os peixes foram alimentados durante o período experimental com a mesma ração utilizada no período de aclimatação, correspondendo a 3% da biomassa, oferecida uma vez ao dia. O fotoperíodo permaneceu 12C:12E e não foram observadas diferenças nos níveis de O_2 dissolvido (5,3 $\pm$ 1,4 $mg.L^{-1}$), pH (7,8 $\pm$ 1,1), temperatura (25,8 $\pm$ 1,6 °C) e amônia (0,09 $\pm$ 0,05 $mg.L^{-1}$) entre os grupos experimentais, durante os cinco dias de exposição.

2.3. Preparo das amostras

Para determinar a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx, o fígado e as brânquias foram homogeneizados na proporção 1:4 (m/v) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, (contendo sacarose 0,5 M, EDTA 1mM, DL-dithiothreitol 1mM, KCl 0,15 M e inibidor de protease (PMSF) 1 mM), e em seguida, centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4 ºC. A fração sobrenadante foi coletada e novamente centrifugada a 50.000 g por uma hora a 4 ºC. O

sobrenadante obtido foi coletado e estocado a -80 ºC para as análises da atividade da CAT e GPx, enquanto que o pellet foi re-suspendido em 100 µl de tampão Tris 0,1 M pH 7,5 (contendo EDTA 1 mM, DTT1 mM, KCl 0,1M e 20% de glicerol) e utilizado para as análises de EROD e BROD. Para analisar a AChE e CbE as amostras foram homogeneizadas na proporção 1:4 (m/v) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos a 4 ºC e o sobrenadante foi coletado para quantificar a atividade enzimática. As proteínas foram quantificadas seguindo metodologia proposta por Bradford (1976).

2.4. Análises enzimáticas

A avaliação da atividade da enzima CAT foi realizada no espectrofotômetro Thermo Evolution 300 com feixe duplo, utilizando método descrito por Beutler (1975), que se baseia na decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima monitorando o decréscimo da absorbância em 240 nm a 30 ºC por 1 minuto.

O ensaio da enzima GPx foi realizado no leitor de microplacas Victor TM X3 (Perkin Elmer®). A atividade GPx foi avaliada monitorando a oxidação do NADPH (ligada à redução da glutationa dissulfeto por um excesso de glutationa redutase) a 340 nm, e usando como substrato o hidroperóxido de *t*-butila, como descrito por Sies et al. (1979). As atividades da CAT e da GPx foram expressas em U.mg de proteína^{-1}.

As atividades da EROD e da BROD foram medidas pelo método fluorimétrico na fração microssomal, segundo metodologia proposta por Burke e Mayer (1985), com algumas modificações. Os substratos 7-etoxiresorufina e 7-benziloxiresorufina foram usados no ensaio da EROD e BROD, respectivamente. A formação do produto fluorescente, a resorufina (λ_{excit}= 537 nm, λ_{emiss} = 583 nm), foi monitorada por 3 min, a 30 ºC no leitor de microplacas Victor TM X3 (Perkin Elmer®), na presença de NADPH. As atividades da EROD e da BROD foram expressas em pmol.min.mg de proteina^{-1}.

A atividade das esterases foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Ellman et al (1961), monitorando a formação do produto da reação entre o derivado tiólico do substrato acetiltiocolina (AChE) ou feniltioacetato (CbE) com ácido 5,5-ditio-bis- (2-nitrobenzóico) (DTNB) em 405 nm e 25 ºC. A leitura foi realizada no leitor de microplacas Victor TM X3 (Perkin Elmer) e a atividade enzimática foi expressa em U.mg de proteína^{-1}.

2.5. Peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica foi avaliado em brânquias e fígado dos peixes seguindo o protocolo proposto por Esterbauer e Zollner (1991), com algumas modificações. Os tecidos

foram homogeneizados na proporção 1:3 (m/v) em tampão Tris–HCl 100 mM, pH 8,0. Após a homogeneização, 300 μL da solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2M foram adicionados em cada amostra. Em seguida, a mistura foi incubada a 90° C por 40 minutos. Após a incubação, as amostras forma mantidas por cinco minutos no gelo, para bloqueio da reação. Posteriormente, foi realizada uma extração de fase líquida com 1 mL de n-butanol e centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. Por fim, a absorbância do sobrenadante foi medida a 535 nm no leitor de microplacas Victor TM X3 (Perkin Elmer). A quantificação do produto da reação MDA-TBA foi realizada com base em uma curva de calibração utilizando como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano (TMP). Os dados foram expressos em pmol MDA/mg tecido.

2.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). A normalidade dos dados foi verificada usando *Normal Probability Plots of Residuals* enquanto a homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene, assumindo nível de significância de 0,05.

Os *outliers* foram identificados pelo teste *Box plots* e os valores foram substituídos pela mediana do respectivo grupo, quando apropriado. Os grupos experimentais foram comparados pelo *General Linear Model* (GLM) com formato de *one way* ANOVA (Quinn et al., 2002; McDonald et al., 2014). Quando apropriado, aplicamos o teste post hoc de Fisher para avaliar qualquer diferença significativa entre os grupos. Para avaliar o grau de associação individual entre as concentrações de MF testadas e os parâmetros bioquímicos, foi utilizada a correlação de pontos de Spearman. Os gráficos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e os dados foram expressos como média ± 95% de intervalo de confiança de seus valores biológicos e $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significante (Quinn,et al., 2002; McDonald et al., 2014).

3. Resultados

3.1. Atividade da CAT e GPx

Não foram observadas alterações na atividade da CAT e da GPx no fígado das tilápia após cinco dias de exposição ao MF. No entanto, a atividade da CAT nas brânquias dos animais diminuiu ($p = 0,0000$) 2,20 vezes no grupo exposto a 20 $ng.L^{-1}$, 5,02 vezes no grupo exposto a 100 $ng.L^{-1}$ e 4,06 vezes no grupo exposto a 200 $ng.L^{-1}$ de MF, quando comparados ao grupo

controle (Fig. 1A). Do mesmo modo, a atividade da GPx também diminuiu ($p = 0,01283$) em todos os grupos expostos ao MF (3,21; 2,66 e 3,67 vezes nos grupos expostos a 20, 100 e 200 $ng.L^{-1}$ de MF, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (Fig.1 B). Os resultados da correlação mostraram que a o MF teve um efeito inibitório concentração-dependente sobre as enzimas CAT (Fig. 1A) e GPx (Fig. 1B) nas brânquias, que apresentaram uma atividade menor dessas enzimas quanto maior foi a concentração do fármaco.

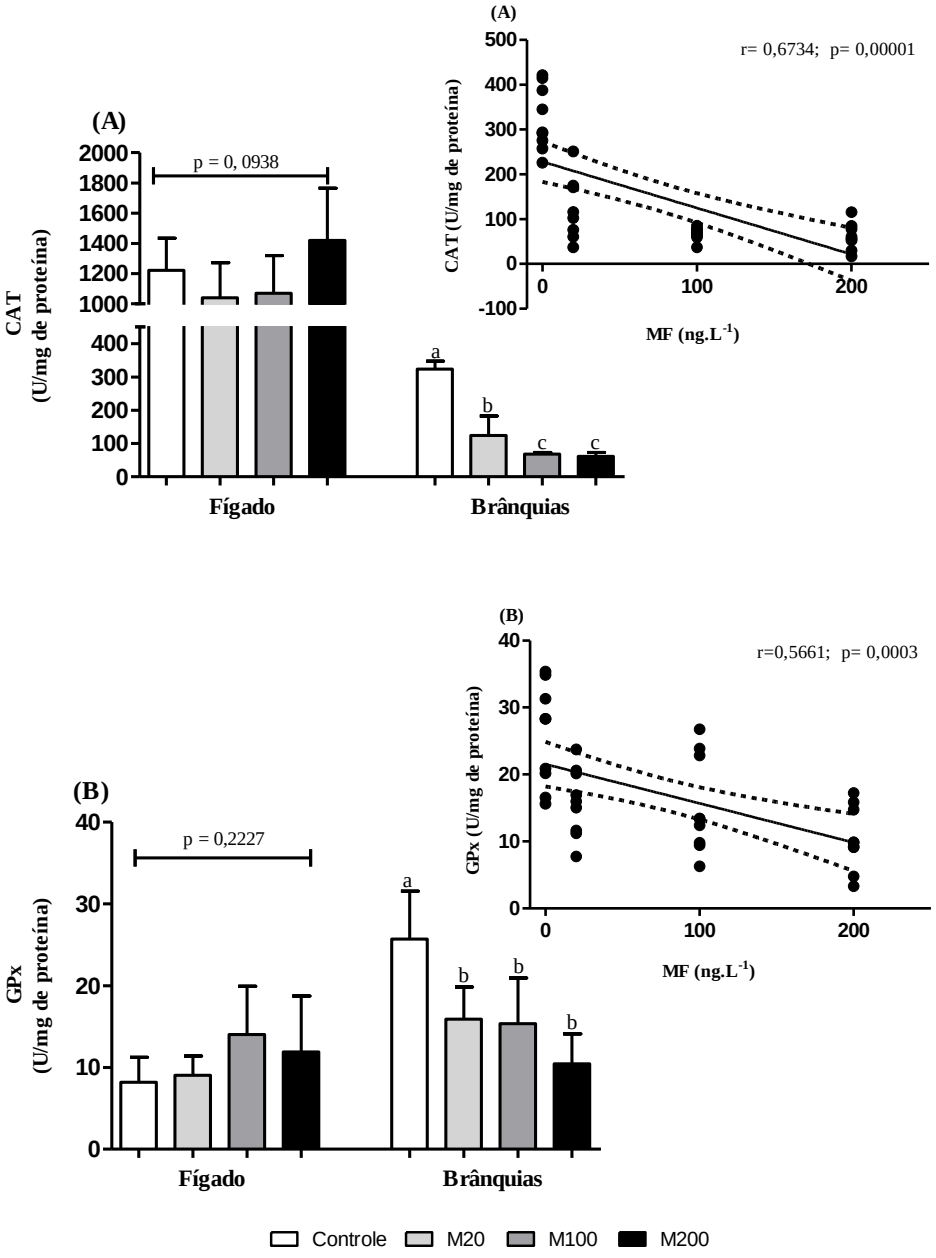


Figura 1: Atividade das enzimas antioxidantes (A) catalase (CAT) e (B) glutationa peroxidase (GPx) em fígado e brânquias de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L^{-1}), por 5 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (GLM o formato *one way* ANOVA, seguido pelo teste de Fisher). Os valores estão representados por média ± 95% IC e a correlação foi feita pelo teste de Spearman.

3.2. Atividade da EROD e BROD

As atividades da EROD (Fig. 2A) e BROD (Fig. 2B) não apresentaram nenhuma alteração em ambos os órgãos analisados e em nenhuma das concentrações testadas.

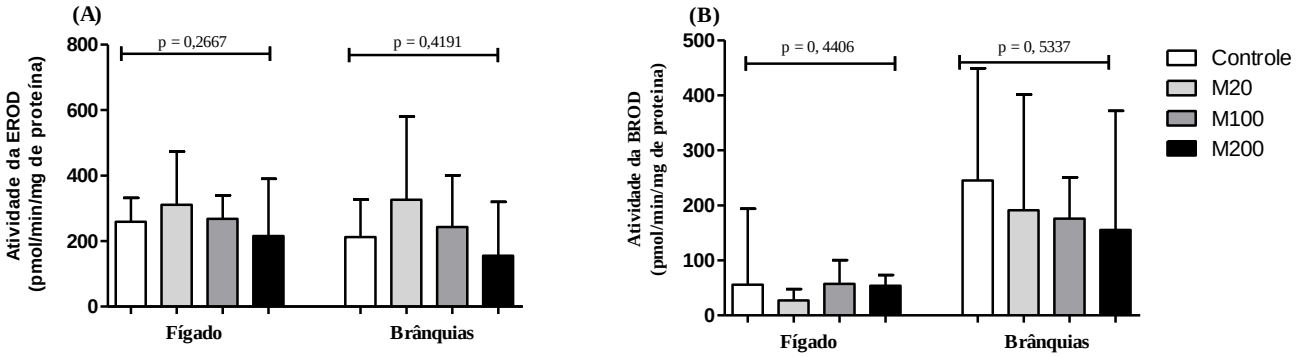


Figura 2: Atividade das enzimas de biotransformação (A) 7-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) e (B) 7-benzilóxiresorufina O-desalquilase (BROD) em fígado e brânquias de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L^{-1}), por 5 dias (GLM o formato *one way* ANOVA, seguido pelo teste de Fisher).Os valores estão representados por média ± 95% IC.

3.3. Atividade da AChE e CbE

Não houve diferenças na atividade da AChE no fígado dos peixes. Nas brânquias houve uma diminuição (p = 0,0049) da atividade nos grupos expostos a 100 e 200 ng.L^{-1} de MF, em relação ao grupo controle (1,64 e 1,43 vezes, respectivamente) (Fig. 3A). Nenhuma alteração foi observada na atividade da CbE no fígado, porém, nas brânquias foi observado um aumento (p = 0,0111) nos grupos expostos a 20 e 200 ng.L^{-1} em relação ao grupo controle (Fig. 3B). Nessas análises, o MF mostrou ter um efeito inibitório concentração-dependente apenas para a AChE (p = 0,0004) nas brânquias, que também apresentaram uma atividade menor dessas enzimas quanto maior foi a concentração do fármaco (Fig. 3A).

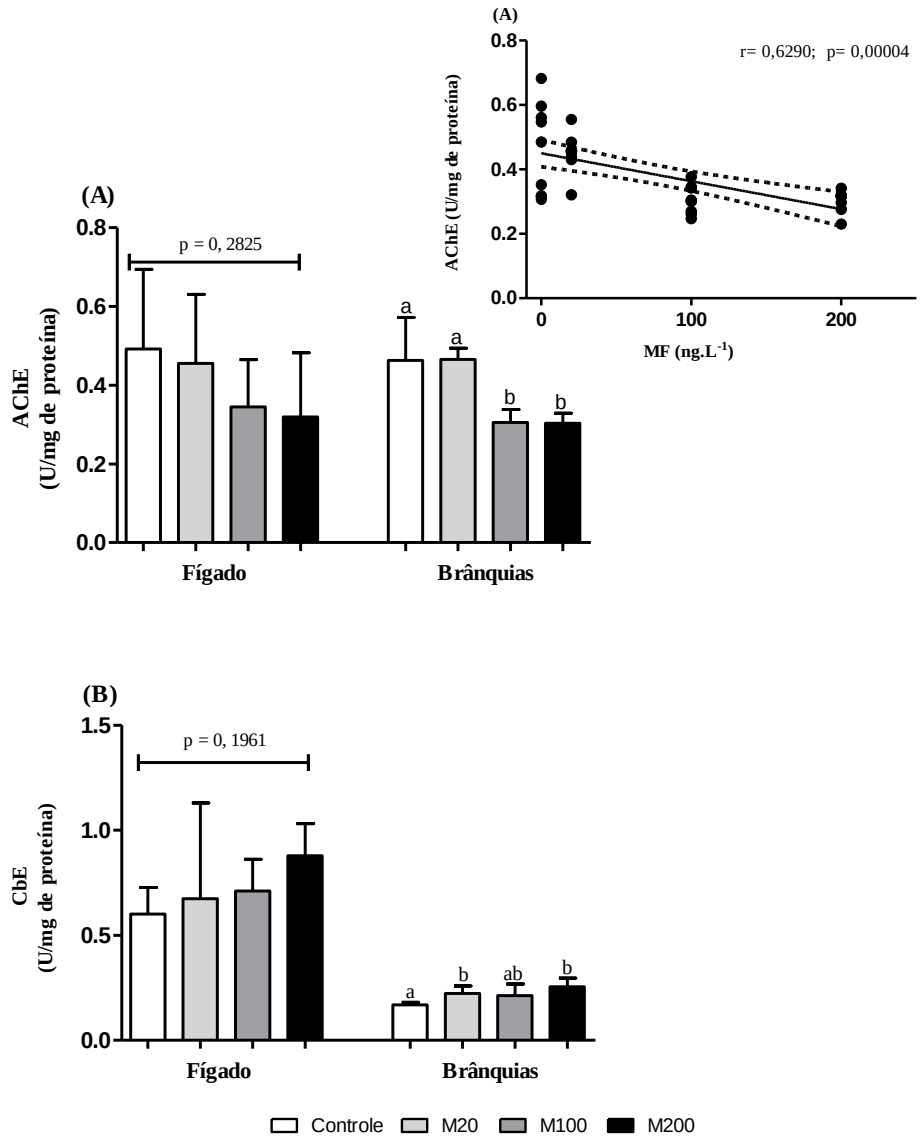


Figura 3: Atividade das enzimas (A) acetilcolinesterase (AChE) e (B) carboxilesterase (CbE) em fígado e brânquias de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L^{-1}), por 5 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (GLM o formato *one way* ANOVA, seguido pelo teste de Fisher). Os valores estão representados por média ± 95% IC e correlação foi feita pelo teste de Spearman.

3.4. Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica foram menores no fígado dos animais de todos os grupos expostos em relação ao grupo controle (1,51; 1,52; 1,72 vezes nos grupos expostos a 20, 100 e 200 ng.L^{-1} de MF, respectivamente). Nas brânquias, não foram observadas alterações em nenhum dos grupos (Fig. 4).

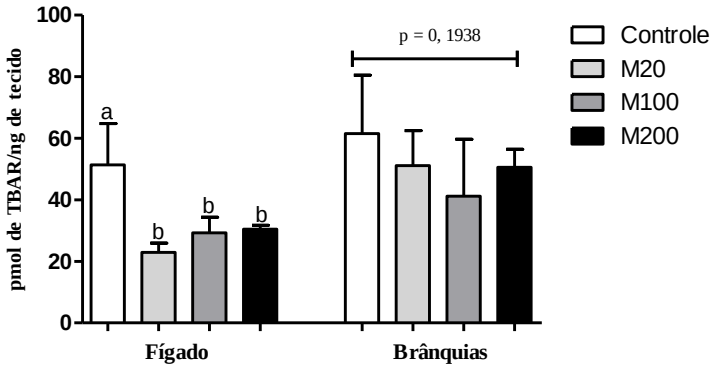


Figura 4: Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em fígado e brânquias de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de metilfenidato (0, 20, 100 e 200 ng.L^{-1}), por 5 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, teste de FISHER $p < 0,05$). Os valores estão representados por média ± 95% IC.

4. Discussão

Estudos demonstram que fármacos como ansiolíticos, antidepressivos e anti-hipertensivos, quando presentes no ambiente aquático, podem causar alterações comportamentais, genotóxicas e bioquímicas em organismos não-alvo (Cortez et al., 2018; Bisesi et al., 2014; Henry and Black, 2008). Porém, são escassos trabalhos na literatura que caracterizam os efeitos ecotoxicológicos do MF em organismos aquáticos.

Em longo prazo o processo de inibição dos transportadores de DA pelo MF pode causar déficits no sistema dopaminérgico e serotoninérgico dos indivíduos (MARTINS et al., 2006; MIYAZAKI; ASANUMA, 2008; VOLKOW et al., 1998), gerando ERO devido ao acentuado metabolismo da DA pela monoamina oxidase, e prejudicando a produção de ATP (LAVOIE; SMITH; PARENT, 1989; VIRMANI et al., 2006), o que poderia modular positivamente a atividade de enzimas antioxidantes. As enzimas CAT e GPx, atuam metabolizando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) e água (H_2O), auxiliando na sua remoção, afim de evitar danos oxidativo às moléculas (Oost et al., 2003; Keeling e Smith, 1982; Sies, 1993). Estudos mostram uma indução dos sistemas antioxidantes e de detoxificação em peixes (SOLÉ et al., 2006) e mexilhões (CORTEZ et al., 2018) após exposição a fármacos nas concentrações de ng.L^{-1} a μg.L^{-1}. Desta maneira, nesse trabalho, esperava-se que o MF em concentrações ambientais, causasse uma modulação positiva dessas enzimas como uma resposta protetora à possíveis danos celulares induzidos por esse fármaco.

Ao contrário do esperado, nossos resultados mostraram que nas brânquias, mas não no fígado, o MF teve um efeito inibitório concentração-dependente tanto na atividade da CAT como da GPx. De uma maneira geral, observamos que tilápias do Nilo expostas à diferentes concentrações do MF, apresentaram respostas concentração-dependente de uma forma mais expressiva em brânquias do que em fígado. No entanto, o fato das alterações terem ocorrido apenas nas brânquias e não no fígado, pode estar relacionado com o fato das brânquias terem uma grande área de superfície e permeabilidade (AMEUR et al., 2015; SANCHO; FERRANDO; ANDREU, 1997) e serem o primeiro órgão de contato do animal com ambiente e, consequentemente, com o contaminante (FONTES et al., 2017; TREVISAN et al., 2016). Em concordância com esses resultados, Gomes e colaboradores (2008) observaram uma diminuição da atividade da catalase (CAT) no cérebro de ratos Wister após exposição aguda ao MF (1 mg/kg). A diminuição concentração-dependente da atividade da CAT e da GPx na brânquia demonstra um efeito negativo do MF em concentrações ambientalmente realísticas para os peixes, deixando os organismos mais suscetíveis ao estresse oxidativo.

Enzimas do complexo do citocromo P450 estão envolvidas na biotransformação de diversos compostos, incluindo diversos fármaco (JEMEC et al., 2007). Nesse trabalho, não observamos alterações na atividade da EROD e da BROD no fígado e nas brânquias das tilápias após a exposição ao MF. Com isso, esses resultados indicam que a isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A) não teve efeito na biotransformação do fármaco nas concentrações testadas.

A análise da inibição da AChE tem sido um biomarcador de efeito no sistema nervoso muito utilizado após exposição dos organismos a contaminantes emergentes, como fármacos (FONTES et al., 2017; LIONETTO et al., 2013). A AChE é uma enzima importante que está associada ao desenvolvimento cerebral, aprendizagem, memória e dano neural (Metz e Tracey, 2005; Zimmerman e Soreq, 2006). Nesse trabalho, o MF causou um efeito inibitório concentração-dependente na atividade enzimática da AChE nas brânquias dos animais, o que nos leva a sugerir um possível aumento de ACh nesse tecido, o que pode causar uma hiperestumulação do SNC. Nosso resultado, apresenta-se de acordo com estudo realizado com mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos por 10 dias ao anti-inflamatório acetaminofeno (23 e 403 μg. L^{-1}), que também observou inibição da AChE nas brânquias desses animais (SOLÉ et al., 2006). Adicionalmente, Tzavara e colegas (2006) relataram um aumento na liberação de ACh em cérebro de ratos após administração aguda de MF (1,0 e 3,0 mg / kg), mostrando também a influência do MF no sistema colinérgico.

As enzimas CbEs desempenham um papel importante na hidrólise de ésteres carboxílicos, o que as tornam enzimas importantes para metabolização e subsequente

detoxificação de certos fármacos (POTTER; WADKINS, 2006). Após absorção, em um período de 48 a 96 horas o MF será desesterificado, através do sistema microssomal hepático, em ácido ritalínico (ZHU et al., 2008; SUN et al.,2004; GOODMAN e GILMAN, 2003). Tendo em vista a importância da metabolização desse fármaco em seu metabólito e que esse processo acontece no fígado, o aumento observado na atividade da CbE das brânquias pode estar relacionado a uma tentativa dos organismos em metabolizar no MF. Esse dado corrobora o fato das brânquias terem sido mais responsivas do que o fígado frente a exposição ao MF, e poderia explicar a ausência de alterações bioquímicas no fígado. É possível que o aumento da CbE, e assim sua consequente metabolização, tenham diminuído a biodisponibilidade do MF para o fígado, protegendo este órgão contra possíveis efeitos negativos desse fármaco.

Por fim, avaliamos o efeito do MF na integridade dos lipídeos de membrana dos tecidos analisado, através do processo de peroxidação lipídica, que também é uma importante consequência do estresse oxidativo (STEGEMAN et al., 1992). Um dos produtos da lesão oxidativa a lipídios é o malondialdeído (MDA), um aldeído que é um subproduto derivado de a decomposição de hidroperóxidos lipídicos formados pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (FELICIO et al., 2018; ALMEIDA et al., 2005; OOST et al., 2003). Neste trabalho, não observamos alterações nos níveis de TBARS nas brânquias, porém no fígado foi observado uma diminuição da peroxidação lipídica em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle. Podemos supor que os peixes não tiverem aumento da peroxidação lipídica, por não apresentarem também uma indução do sistema antioxidante. Além disso, um trabalho do nosso grupo de pesquisa (ainda não publicado) mostrou uma relação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) no metabolismo do MDA de peixes *Danio rerio*, e com isso, em nossos resultados também pode ter ocorrido essa relação, onde a diminuição nos níveis de MDA por ter ocasionado um provável aumento da ALDH. É sabido que a ALDH atua no metabolismo da dopamina, convertendo a mesma em DOPAC (ácido 3,4-di-hidroxifenilacético) (LU et al., 2018). Assim, podemos sugerir que um possível bloqueio da receptação da dopamina no fígado dos peixes devido ao MF possa ter causado um aumento nas concentrações da dopamina, ativando sua conversão à DOPAC pela ALDH. Uma vez induzida, a ALDH aumentaria a metabolização do MDA, explicando a diminuição significativa dos níveis de MDA observados nos fígados dos peixes expostos ao MF. Entretanto, essa hipótese permanece por ser melhor esclarecida.

5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o efeito da exposição ao MF em concentrações ambientalmente realísticas, foi mais expressivo nas brânquias do que no fígado das tilápias do Nilo. Foi observado uma diminuição concentração-dependente tanto na atividade das enzimas antioxidantes como na atividade das AChE nas brânquias dos animais, o que pode ter deixado os animais mais suscetíveis ao estresse oxidativo e a efeitos de hiperestimulação do SNC, respectivamente. Observarmos também, uma possível metabolização do fármaco devido ao aumento da CbE nas brânquias dos animais, porém, não observando alterações nas enzimas de biotransformação. A diminuição na peroxidação lipídica das membranas no fígado reforça a ausência de indução do sistema antioxidante mediante ao fármaco. No entanto, mesmo não observando induções no sistema antioxidante desses animais, as alterações observadas reforçam a necessidade de mais estudos que permitam esclarecer melhor os efeitos que o MF pode causar em organismos não-alvo.

6. Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. 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 e ff ects 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.; KLAINE, 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 Pharmaceuticals in the aquatic environment : A critical review of the evidence for health effects in fish. v. 8444, 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 re fl ect 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 α2-adrenergic and dopamine D1receptors. **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 D $_3$ 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-HT1B 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 en v ironmental risk assessment : a re v iew. 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 fi sh 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.

SATOH, 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 Methyiphenidate. **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.

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 e ff ects 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.; KLAINE, 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 Pharmaceuticals in the aquatic environment : A critical review of the evidence for health effects in fish. v. 8444, 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 re fl ect 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 α2-adrenergic and dopamine D1receptors. **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 D $_3$ 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-HT1B 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 en v ironmental risk assessment : a re v iew. 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 fi sh 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.

SATOH, 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 Methyiphenidate. **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.