

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR ER α E DA
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS PREJUÍZOS DE
MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO CAUSADOS
PELO POLUENTE AMBIENTAL TRIBUTILESTANHO
(TBT) EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

IGOR FERRAZ DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Vitória, Abril de 2019

IGOR FERRAZ DA SILVA

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR ER α E DA
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS PREJUÍZOS DE
MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO CAUSADOS PELO
POLUENTE AMBIENTAL TRIBUTILESTANHO (TBT) EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Prof^a Dr^a Livia Carla de Melo Rodrigues.

Coorientador: Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli

Vitória
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO AO TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula do(a) Candidato(a): 2017131335

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Envolvimento do Receptor ER α e da Peroxidação Lipídica nos Prejuízos de Memória de Reconhecimento Causados Pelo Poluente Ambiental Tributilestanho (TBT) em Camundongos Fêmeas", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Igor Ferraz da Silva, no dia 10 de março de 2010, às 9h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Vitória – ES, 10 de março de
2019.**

Prof^a. Dr^a. Livia Carla de Melo Rodrigues

(Orientadora)

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli

(Coorientador)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Fernanda Schuck

(Membro Externo)

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos

(Membro Interno)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Da Silva, Igor Ferraz, 1995

Envolvimento do Receptor ER α e da Peroxidação Lipídica nos Prejuízos de Memória de Reconhecimento Causados Pelo Poluente Ambiental Tributilestanho (TBT) em Camundongos Fêmeas. [Vitória] 2019

iv, 56 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2019)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

I. Neurociências

I.PPGCF/UFES.....II.Título (série).....I

Dedico este trabalho à memória de minha falecida mãe, Maria Ferraz, e da ativista Marielle Franco. Ambas mulheres negras, que em vida nunca negaram amor a todos aqueles deixados à margem da sociedade.

“We’re the lions at the gate; we’re the diamonds in your brain, the desire in your veins for the violence, and the writers of your fate” – Xenon, Chino Moreno (Deftones)

AGRADECIMENTOS

À **UFES** e ao **CNPq**, pelo apoio financeiro e estrutural que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus pais, **Maria** e **Elis Manoel** (in memoriam), por todo o amor e carinho que me deram, pelos valores que me ensinaram, e por todo o esforço feito, mesmo nos momentos mais difíceis, para que eu pudesse chegar aonde eu cheguei. Aos meus familiares, especialmente minha tia **Izaura**, minha avó **Zélia**, minhas primas **Karen** e **Kátia**, por todo amor, apoio e cuidado que tiveram comigo, antes e depois do falecimento dos meus pais.

À professora **Lívia**, por estes 7 anos de parceria, pela confiança, pelo carinho, e pela preocupação comigo, enquanto aluno e pessoa. Diariamente, me sinto o aluno mais sortudo do mundo por tê-la como orientadora.

Aos meus colegas de laboratório no **LANEP** e no **LCCNPF**, todos aqueles que ainda estão conosco, e também aos que já tive o prazer de conhecer; em especial **Thais Brenda**, **Jamile Mendes**, **Matheus Loureiro**, **Jamille Caneva** e **Gabriel**. Agradeço especialmente ao **Henrique**, pela ajuda em alguns experimentos e pelas caronas, e ao **Matheus Cavatti**, uma das amizades mais valiosas que este laboratório me deu, por todo o companheirismo e paciência com os meus ataques!

Ao professor **Jones**, pelo conhecimento passado e por todo o apoio que foi dado a mim durante todos esses anos de colaboração; agradeço também a todos os membros do seu laboratório por terem me acolhido tão bem quando precisei em especial **Eduardo** e **Charles**, cuja ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores do PPGCF, com quem tive a honra de ter aprendido durante estes anos, pelos ensinamentos que permitiram o meu amadurecimento como aluno e profissional. Agradeço também ao corpo discente do PPGCF, pela confiança em mim enquanto seu representante no colegiado, e em especial, aos meus colegas leoninos de Comissão Discente, **Pollyana** e **Antônio**, e nossa mentora, **Renata**.

À comissão examinadora, por terem aceitado avaliar o meu trabalho, e por todas as considerações atenciosamente feitas.

Aos meus amigos da turma 2012/1, **Margarida**, **Emanuela**, **Matheus**, **Júlia** e **Lívia**, pela amizade e pelos bons momentos, e por todas as conversas no bar do Pedro.

Aos meus amigos idosos da Biologia, por todo o carinho, por todas as festas e por me aguentarem desabafando no Twitter e no grupo. Me sinto na obrigação de citar nominalmente alguns, que de forma especial, me deram muita força nos últimos anos: **Sávio**, por todas as fotos e vídeos fofinhos diariamente; **Felipe** e **Margarida**, pelos lanches e maratonas na Netflix; **Bruno**, pelas vergonhas que passamos, e **Mateus Melotti**, pelas parcerias que fizemos e ainda vamos fazer

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	12
1.2. TRIBUTILESTANHO.....	13
1.3. ESTROGÊNIO E CÉREBRO.....	15
1.4. MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. ANIMAIS.....	20
3.2. DROGA.....	20
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.4. AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	21
3.5. ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	21
3.6. EUTANÁSIA.....	23
3.7. WESTERN BLOT.....	23
3.8. AVALIAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	24
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. CICLO ESTRAL.....	26
4.2. NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR ER α	28
4.3. MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO.....	28
4.4. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

O tributilestanho (TBT) é um composto organoestânico utilizado em diversas áreas da agricultura e da indústria. Estudos recentes vêm demonstrando que o TBT possui efeitos sobre diversos órgãos e tecidos em roedores e outros animais, impactando principalmente o sistema endócrino ao agir como um inibidor da enzima aromatase, e diminuindo os níveis sistêmicos de estradiol. Para os experimentos, camundongos fêmeas receberam TBT em doses diárias de 250 ng/kg, 500 ng/kg e 750 ng/kg, ou sua solução veículo. Os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos para uma avaliação da memória de reconhecimento, tiveram seus ciclos reprodutivos analisados e foram avaliados quanto à peroxidação lipídica e expressão de ER α no córtex pré-frontal e no hipocampo. Foi observado que o TBT, nas doses de 500 ng/kg e 750 ng/kg, altera a expressão do receptor ER α , com uma expressão reduzida no hipocampo dos animais que receberam a dose de 750 ng/kg, e no córtex pré-frontal dos animais que receberam a dose de 500 ng/kg, quando comparada ao controle. O TBT foi capaz de induzir peroxidação lipídica em todas as doses no córtex pré-frontal, quando comparado ao controle. A memória de reconhecimento de curto e longo prazo foi afetada negativamente nos animais que receberam as doses de 250ng/kg, 500 ng/kg e 750 ng/kg, quando comparada ao controle. Os ciclos reprodutivos sofreram alterações nos grupos expostos ao TBT, em relação ao controle. Nossos dados sugerem que o TBT apresenta a capacidade de afetar a cognição de camundongos fêmea, além de alterar a expressão do receptor de estrogênio ER α em diferentes áreas cerebrais e promover estresse oxidativo no córtex pré-frontal.

Palavras-chave: Córtex pré-frontal; Estresse Oxidativo; Estrogênio; Hipocampo; Memória de Reconhecimento; Tributilestanho.

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is a synthetic organotin compound used in several areas of agriculture and industry. Recent studies have demonstrated that TBT has effects on several organs and tissues in rodents and other animals, impacting their endocrine system due to its endocrine disrupting effects, causing abnormal estrogen levels. In this study, female mice were exposed to TBT in daily doses of 250ng/kg, 500 ng/kg and 750 ng/kg, and their recognition memory performance was tested using the novel object recognition test. We further assessed the estrous cyclicity, prefrontal cortex (PFC) and hippocampus estrogen receptor α (ER α) protein expression and oxidative stress. TBT impaired recognition memory in short and long term, in all doses. We found ER α receptor expression reduced in the hippocampus of the subjects that received the dose of 750 ng/kg, and decreased in the PFC of the subjects that received the dose of 500 ng/kg, when compared to Control group. TBT induced lipid peroxidation in the PFC in all doses, when compared to Control. It was also possible to observe alterations in the reproductive cycle of the animals, in which the groups treated with TBT had longer cycles. Our data suggest that TBT has the capacity of affecting the cognition of female mice. TBT can also modify the expression profile of ER α in different cerebral areas and promotes oxidative damage in PFC.

Keywords: Estrogen Receptor; Hippocampus; Oxidative Stress; Prefrontal Cortex; Recognition Memory; Tributyltin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química do tributilestano. Um átomo de estanho (Sn), ligado a três grupos carbônicos butil e um radical aniônico.....13
- Figura 2: Fluxograma do desenvolvimento das atividades do desenho experimental.....21
- Figura 3: Esquematização do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO). (A): O teste se utiliza de 4 objetos: 2 objetos iguais (A1 e A2) e outros 2 diferentes (B1 e C1). (B): na sessão treino, o animal explora os dois objetos iguais.(C): 1h30min após a sessão treino, o objeto A2 é trocado por B1 e o animal retorna à caixa. (D): 24 h após a sessão treino, o objeto B1 é trocado por C1 e o animal retorna à caixa.....23
- Figura 4: Representação esquemática do ciclo estral dos animais, durante 14 dias de tratamento. P: proestro; E: estro; M/D: metaestro-diestro.....26
- Figura 5: Comparação entre as médias da duração das fases do ciclo estral e do comprimento total do ciclo entre os grupos analisados (n = 16). (A): duração média do proestro; (B): duração média do estro; (C): duração média do metaestro-diestro; (D): duração média de um ciclo completo. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. **p < 0.0127
- Figura 6: Níveis de expressão do receptor de estrogênio ER α após exposição ao TBT (n = 16). (A): Perfil de expressão no córtex pré-frontal. (B): Perfil de expressão no hipocampo. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. *p < 0.05, **p < 0.01.....28
- Figura 7: Avaliação da memória de reconhecimento de camundongos fêmea no Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) (n = 48). (A): Avaliação da memória de reconhecimento de curto prazo, realizada 1h30min após o treinamento. (B): Avaliação da memória de reconhecimento de curto prazo, realizada 24h após o treinamento. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. *p < 0,05.....29
- Figura 8: Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica através do ensaio TBARS (n= 16). (A): Níveis de TBARS no córtex pré-frontal. (B): Níveis de TBARS no hipocampo. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. **p < 0.05, ***p < 0.01.....30

LISTA DE ABREVIações

CPF	Córtex pré-frontal
E	Estro
E₂	17 β -estradiol
ER	Receptor de estrogênio
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
ERα	Receptor de estrogênio alfa
ERβ	Receptor de estrogênio beta
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GP_{ER}	Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
M-D	Metaestro-diestro
MCP	Memória de curto prazo
MLP	Memória de longo prazo
OT	Organoestânico
P	Proestro
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBT	Tributilestanho
TBT-OH	Hidróxido de tributilestanho
TMT	Trimetilestanho
TRO	Teste de reconhecimento de objetos

1- INTRODUÇÃO

O conhecimento acerca dos efeitos tóxicos e curativos de produtos de origem animal, vegetal e mineral está presente na humanidade desde os seus primórdios, e vem sendo aprimorado ao longo dos milênios. Sendo primeiramente associado a áreas como a Alquimia, o estudo dos venenos, que hoje é conhecido como toxicologia, foi um tema de grande interesse dos intelectuais de diferentes eras. O interesse nos aspectos toxicológicos da exposição acidental a compostos químicos, em especial os de origem inorgânica, como os metais pesados, também teve seu início há muitos séculos. Em 1567, foi publicado postumamente o trabalho *Von der Bergsucht und anderen Bergkrankheiten* (Sobre a Doença dos Mineiros e outras enfermidades dos mineiros), do médico e alquimista suíço Paracelsus, onde ele explorou a etiologia dos problemas de saúde de trabalhadores de minas e ligou essas patologias à toxicidade de metais como o mercúrio e o chumbo. Desde então, houve um crescimento massivo de publicações científicas no campo da toxicologia, muito devido às novas condições de vida nas sociedades modernas após as duas Revoluções Industriais, onde a exposição a agentes tóxicos das mais variadas naturezas tornou-se mais frequente. Como resultado, sucedeu-se uma grande diversificação dessa disciplina com o surgimento de subáreas cada vez mais específicas, tais como a toxicologia clínica e experimental, a toxicologia forense e a toxicologia ambiental (Milles, 1999).

A partir da toxicologia ambiental e outras ciências relacionadas à saúde ambiental, surgiu na década de 1970 o conceito de toxicologia comportamental (Weiss & Laties, 1975), uma nova subárea da toxicologia com interesse nas alterações comportamentais que um organismo intoxicado apresenta. Os primeiros trabalhos acerca desse tema focaram principalmente nos efeitos tóxicos de compostos metálicos sobre o sistema nervoso de organismos que foram expostos a esses agentes devido à contaminação ambiental (Weiss, 1983). Na toxicologia comportamental dos dias de hoje, existe um grande interesse em uma classe de poluentes químicos conhecidos como desreguladores endócrinos.

1.1 – Desreguladores Endócrinos

Desreguladores endócrinos são substâncias capazes de alterar o funcionamento e a modulação do sistema endócrino (Colborn et al., 1993), aumentando ou bloqueando a síntese, liberação e ação de hormônios naturais, ou até mesmo atuando como um xeno-hormônio, ao mimetizar os efeitos fisiológicos de um certo hormônio endógeno (Tabb & Blumberg, 2006). Dentre os principais desreguladores endócrinos ambientais com efeitos neurológicos e comportamentais estão o bisfenol A (Yeo et al., 2013; Elsworth et al., 2015), os ftalatos (Chopra et al., 2014; Leon-Oléa et al., 2014), pesticidas (Leon-Oléa et al., 2014) e compostos organometálicos, como o metilmercúrio (Farina et al., 2011) e organoestânicos (Krüger et al., 2005).

Os organoestânicos (OTs) são compostos organometálicos que apresentam uma ou mais ligações entre um átomo de carbono e um átomo de estanho (Figura 1), sendo representados através da fórmula geral $R_n(Sn)X_n$, onde R é um grupo alquil ou aril, X uma espécie aniônica e n é um número variável entre 1 e 4 (Blunden & Evans, 1990). Além de atuar como desreguladores endócrinos, afetando o metabolismo dos hormônios gonadais (Omura et al., 2001; Grote et al., 2004), os organoestânicos apresentam efeitos citotóxicos e genotóxicos (Ahmad et al., 2008; Varela-Ramirez et al., 2011), além de atravessarem a barreira hematoencefálica, apresentando também efeitos neurotóxicos (Bouldin et al., 1981; Krüger et al., 2005).

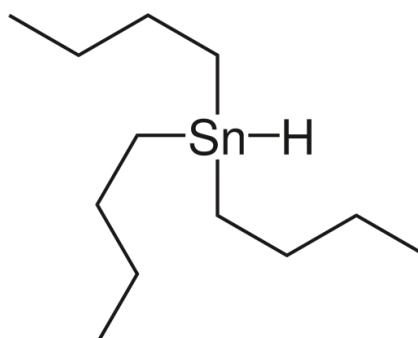


Figura 1: Estrutura química do tributilestanho. Um átomo de estanho (Sn), ligado a três grupos carbônicos butil e um radical aniônico

1.2 – Tributilestanho

O tributilestanho (TBT) está entre os compostos organoestânicos com uso comercial como biocida devido à sua toxicidade. A toxicidade dos organoestânicos está associada ao número de ligações entre o átomo de estanho e os grupos orgânicos, sendo que os compostos cujo átomo de estanho está associado com três grupos orgânicos apresentam alta atividade tóxica (Hoch, 2001). O seu alto potencial biocida fez com que o TBT se tornasse amplamente utilizado na indústria naval como o principal composto em tintas anti-incrustantes a partir da década de 1960 (ten Hallers-Tjabbes, 1997).

Na década de 1970, porém, foi observado que o TBT apresentava atividade tóxica em organismos que não são os alvos das tintas anti-incrustantes. Entretanto, suas propriedades de desregulador endócrino levavam ao desenvolvimento sexual inadequado em gastrópodes, causando o surgimento de órgãos genitais masculinos em fêmeas, um fenômeno conhecido como “*imposex*”. O *imposex* em fêmeas do gastrópode predador *Ocenebra erinacea* foi observado pela primeira vez em 1970, na baía de Archacon, na França, o que em poucos anos quase levou ao desaparecimento da espécie na região (Gibbs, 1993). Em 1976, a população da ostra comercial *Crassostrea gigas* começou a entrar em declínio devido ao *imposex*. A produtividade da cultura de ostras, que estava entre 10 000 e 15 000 toneladas por ano no início da década de 1970, caiu para 3000 toneladas em 1981, causando um enorme prejuízo econômico para a região (Ruiz et al., 1996; Evans, 2000). Em meados da década de 1970, a entrada de TBT diária nas águas da baía de Arcachon atingiu o pico de 8 kg (Ruiz et al., 1996). Entretanto, somente a partir da década de 1980 que investigações toxicológicas apontaram o TBT como o responsável pela devastação das populações de moluscos marinhos da baía de Arcachon. O impacto ecológico e econômico causado levou a uma série de pesquisas acerca dos mecanismos da toxicidade do TBT e outros organoestânicos, e também a legislações que restringiam o seu uso. Mesmo com todo o esforço, na década de 1990 as tintas antiincrustantes contendo TBT ou outros organoestânicos em sua composição eram utilizadas em cerca de 80% das embarcações de grande porte (IMO, 1994). No Brasil, foi adotado o Princípio da Precaução em

1992, que banuiu o uso de TBT a partir de janeiro de 2003 (Agenda 21, Seção 17.22).

O TBT possui meia-vida extensa, e é altamente suscetível à bioacumulação nas cadeias tróficas, o que favorece a exposição humana através da alimentação de peixes e frutos do mar contaminados, e do contato com água e sedimentos contaminados (Kannan et al., 1995; Chien et al., 2002; Lo et al., 2003). A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos consideram como segura para humanos a exposição ao TBT em uma dose diária de 300 ng/kg (WHO, 1990; EPA, 1997). Porém, mesmo após a legislação regulatória do uso de TBT, os níveis encontrados nas águas marinhas brasileiras são superiores ao limite recomendado. Na baía de Guanabara, no Rio de Janeiro, as concentrações variavam, em média, entre 742 µg/kg e 14 µg/kg, sendo que a concentração máxima registrada foi de 6 000 µg/kg (Almeida *et al.*, 2004), ou seja, uma concentração 20 000 vezes superior ao que se considera aceitável. Na última década, concentrações de TBT, mais altas do que aquela considerada segura, foram verificadas ao longo da costa brasileira (Sant'Anna et al., 2014; Artifon et al. 2016; Maciel et al., 2018).

A partir das observações iniciais feitas em moluscos, foram realizadas diversas investigações acerca dos efeitos nocivos do TBT em outros modelos experimentais e encontrou-se numerosas evidências de sua toxicidade em diferentes órgãos e tecidos. O TBT exerce sua toxicidade em crustáceos, protocordados, peixes e mamíferos, apresentando efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e obesogênicos, além de levar a disfunções reprodutivas. (Grote et al., 2004; Revathi et al.; Gallo & Tosti, 2013; Jordão et al.; Li et al.; Lyssimachou et al.; Podratz et al. 2015; Kanimozhi et al. 2016). Boa parte dos efeitos tóxicos do TBT são devidos à interferência direta do estanho no metabolismo celular (Varela-Ramirez et al., 2011), porém, ao avaliar a toxicidade do TBT no cérebro e suas consequências comportamentais, é necessária uma avaliação em relação aos efeitos dessa substância como desregulador endócrino.

1.3 – Estrogênio e cérebro

O TBT é um inibidor competitivo da aromatase, a enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos na via de síntese de hormônios esteróides (Saitoh *et al.* 2001). O bloqueio da atividade da aromatase acarreta um declínio dos níveis de hormônios estrógenos, ao mesmo tempo em que leva ao aumento nos níveis de hormônios andrógenos, sendo essa a causa da masculinização de fêmeas que sofrem imposex e das disfunções reprodutivas apresentadas em outros organismos. A alteração nos níveis dos hormônios gonadais tem profundo impacto no funcionamento do sistema nervoso central, considerando que a embriogênese e o desenvolvimento do sistema nervoso é modulada pelos hormônios sexuais (Shum *et al.*, 2015). A diminuição nos níveis de 17β -estradiol (E_2), o hormônio mais ativo da classe dos estrogênios, pode levar a diversas consequências nocivas ao cérebro, tanto em machos quanto em fêmeas, devido à sua importante função fisiológica no sistema nervoso.

Além de modular a diferenciação sexual do cérebro e provocar comportamentos sexuais e reprodutivos, o E_2 desempenha uma série de funções neurológicas e comportamentais, principalmente em fêmeas, mas também em machos, como neuroprotetor, antioxidante, antidegenerativo, regulador da ingestão de alimentos e regulador da atividade locomotora (Zhao e Brinton; Nilsen *et al.*, 2006; Eckel, 2011; Prokai *et al.*, 2015; Mosquera *et al.* 2014), além de ser um modulador da ação de fatores neurais de crescimento e da plasticidade sináptica, desempenhando um papel importante na cognição (Walf *et al.*, 2011; Srivastava *et al.* 2013). É bem observada a relação entre os níveis de E_2 e a função cognitiva em mulheres que sofrem um declínio cognitivo e possuem maior incidência de demência do tipo Alzheimer após a queda massiva dos estrogênios na pós-menopausa (Yaffe *et al.* 2000; Wolf *et al.*; Zandi *et al.* 2002). Desta forma, é plausível que organismos expostos ao TBT tenham prejuízos nas funções cognitivas devido tanto à ação neurotóxica do estanho, quanto ao declínio nos níveis endógenos de E_2 , que levam a alterações na modulação das sinapses e deixam o cérebro vulnerável ao estresse oxidativo e à neurodegeneração.

O E₂ age no tecido-alvo através de três receptores: os receptores ER α e ER β , e o recém- descoberto GPER, que é um receptor acoplado à proteína G. Embora as funções do GPER ainda estejam por ser completamente elucidadas, muito se sabe sobre os receptores ER α e ER β no cérebro. Esses receptores estão bem distribuídos pelo córtex pré-frontal e pelo hipocampo, duas regiões cerebrais responsáveis pela aquisição e recuperação de memórias e pelos processos de aprendizado, além de outras funções cognitivas e executivas, como a atenção, a navegação espacial e a tomada de decisões (Kolb, 1984; Sutherland e Rudy, 1989). Os ERs também são encontrados em outras regiões envolvidas nos processos de memória e aprendizagem, como o estriado dorsal e o núcleo accumbens (Mitra *et al.* 2003). Através desses receptores nas regiões citadas anteriormente, o E₂ influencia uma série de funções fisiológicas importantes para a memória e a aprendizagem, como a modulação da neurotransmissão dopaminérgica e a formação de sinapses, principalmente em indivíduos do sexo feminino, mas também nos do sexo masculino (Hajszan *et al.* 2007; Frick *et al.* 2010; Shanmugan e Epperson, 2014; Almey *et al.* 2015). O ER α , especificamente, é o receptor predominante no hipocampo de camundongos (Mitra *et al.* 2003), sendo encontrado nas membranas dos terminais pré- e pós-sináptico no hipocampo e também no córtex pré-frontal, o que permite o E₂ modular rapidamente a transmissão sináptica e a dinâmica dos dendritos (Bailey *et al.* 2011).

1.4 – Memória de Reconhecimento

Dentre os diferentes tipos de processos cognitivos que sofrem influência da modulação neuronal do E₂, podemos destacar a memória de reconhecimento (Inagaki *et al.* 2010; Tuscher *et al.* 2015). A memória de reconhecimento é a capacidade de julgar a ocorrência prévia de um estímulo, e é um processo cognitivo com múltiplos componentes, onde diferentes tipos de informação podem ser utilizados para determinar se certo estímulo, ou conjunto de estímulos, ocorreu previamente e quando ocorreu (Warburton e Brown, 2015).

No que se refere à classificação temporal das memórias, a memória de reconhecimento possui representações dentro de curto e longo prazo, e está intimamente ligada à memória espacial: pistas sensoriais armazenadas pela memória de reconhecimento são fundamentais para a navegação espacial do indivíduo, sendo a memória espacial do ambiente onde se deu o processamento de certo estímulo uma importante informação para dar contexto à memória de reconhecimento. A memória espacial se refere ao “onde”, enquanto a memória de reconhecimento se refere ao “o quê” (Siedlecki e Salthouse, 2015).

Embora a literatura tenha trabalhos acerca da neurotoxicidade do TBT e outros desreguladores endócrinos, pouco se sabe sobre as possíveis consequências comportamentais que a exposição ao TBT traz aos organismos, além de serem escassos os trabalhos relacionando as alterações hormonais com a função cognitiva de organismos expostos a desreguladores endócrinos ambientais.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com tributilestanho sobre parâmetros comportamentais e a modulação pelo sistema neuroendócrino em camundongos fêmeas.

2.2 – Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos da exposição crônica ao TBT sobre os ciclos reprodutivos de camundongos fêmeas;
- Verificar os efeitos da exposição crônica ao TBT sobre a memória de reconhecimento, de curto e longo prazo, de camundongos fêmeas;
- Analisar o perfil de expressão do receptor de estrogênio ER α no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos fêmeas expostas ao TBT;
- Investigar a geração de estresse oxidativo córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos fêmeas expostas ao TBT.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) do sexo feminino (n=64), com idade de oito semanas e pesando aproximadamente 30 g. Os animais foram separados em grupos de dois ou três indivíduos e foram alojados em caixas de polipropileno (28 cm x 17 cm) forradas com maravalha de acordo com a ninhada de procedência. As caixas foram mantidas no Biotério Central da UFES, numa sala com temperatura regulada, e ciclos de 12 horas de claro-escuro. Os camundongos receberam ração e água *ad libitum*. Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do CCS/UFES, e aprovado sob o número 033/2013.

3.2 – Droga

Foi administrado tributilestanho (Sigma, St. Louis, Mo., USA.) em solução etanólica 0.1%. Como controle, foi administrada solução etanólica 0.1%.

3.3 – Delineamento experimental

No experimento, 64 animais foram utilizados, e divididos em 4 grupos (Controle, TBT-250, TBT-500, TBT-750). Os grupos TBT-250, TBT-500 e TBT-750 receberam uma dose da solução de TBT diariamente, via gavagem, nas concentrações de 250 ng/kg, 500 ng/kg e 750 ng/kg respectivamente, por 14 dias. O grupo Controle foi tratado com solução etanólica 0,1% no mesmo volume de solução administrada aos grupos TBT (0,5ml x 30g). Os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos no 15º dia, 24 horas após o término do tratamento com TBT, e à eutanásia por decapitação ao atingirem a fase metaestro-diestro do ciclo estral, após o teste de reconhecimento de objetos. Os ciclos estrais dos animais foram acompanhados todos os dias, desde uma semana antes do início da exposição ao TBT até a eutanásia.

Foram retirados o córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo, posteriormente armazenados em freezer -80°C , para análises bioquímicas.



Figura 2: Fluxograma do desenvolvimento das atividades do desenho experimental

3.4 – Avaliação do Ciclo Estral

A secreção vaginal dos animais foi coletada durante a exposição ao TBT, para que a regularidade do ciclo estral fosse analisada. Foram injetados $6\mu\text{L}$ de solução salina (NaCl 0,9%) na vagina dos animais, com o auxílio de uma micropipeta. O material obtido foi depositado em lâminas, posteriormente fixadas em metanol e coradas com hematoxilina e eosina. Após serem fixadas e coradas, as lâminas foram armazenadas em geladeira e posteriormente analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). O aspecto da secreção vaginal e os tipos celulares encontrados foram utilizados como parâmetro para a determinação da fase do ciclo reprodutivo dos animais. Foram consideradas neste desenho experimental as fases proestro (P), estro (E), e a união das fases metaestro e diestro (M-D), devido à dificuldade de distinção entre as fases e suas transições (Podratz et al., 2015).

3.5 – Avaliação Comportamental

No segundo experimento, utilizamos o Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO), seguindo um modelo adaptado de Ennaceur e Delacour (1988). O TRO é um teste comportamental simples que se baseia no comportamento exploratório inato dos roedores, que têm uma tendência a explorar objetos novos em detrimento a objetos que já foram apresentados a eles previamente, sem a necessidade de recompensa ou punição. A preferência por um objeto novo implica que o objeto previamente apresentado ao animal está armazenado na memória deste (Ennaceur, 2010). O TRO tem as vantagens de ser um teste de curta duração, sem a necessidade da oferta de

estímulos externos, facilmente adaptável e que fornece dados das memórias de curto e longo prazo (Antunes e Biala, 2012).

3.5.1 – Sessão de habituação

O teste se dá em uma caixa confeccionada em acrílico transparente, nas medidas de 600mmx600mmx450mm, recoberta com papel branco nas laterais e preenchida com maravalha. Os objetos utilizados no teste foram confeccionados manualmente usando brinquedos de plástico e massa de modelar (Figura 2A). No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, foi realizada a sessão de habituação, onde o animal foi colocado na caixa, sem nenhum objeto, para que se habituasse ao ambiente, por 10 minutos. Essa etapa é muito importante, considerando que a familiarização com o ambiente e a associação do objeto com pistas espaciais influenciam a memória de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988).

3.5.2 – Sessão de treino e sessões de teste

24 horas após a habituação, na sessão de treino, o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos iguais (A1 e A2), equidistantes na caixa, a 15 cm das paredes laterais, e deixado por 5 minutos para que explorasse o ambiente livremente (Figura 2B). O tempo de exploração de cada objeto foi registrado no programa ANYMaze, para posterior análise através do índice de reconhecimento. No mesmo dia 1,5 horas após a sessão de treino, foi avaliada a memória de curto prazo (MCP), onde o animal foi recolocado na caixa com dois objetos A1 e B1, feitos do mesmo material, porém de formatos diferentes, e deixado por um tempo de 5 minutos para explorar o ambiente (Figura 2C). Para testar a memória de longo prazo (MLP), o animal foi recolocado na caixa 24 horas após a sessão de treino, com dois objetos (A1 e C1), e o animal teve 5 minutos para explorar o novo ambiente (Figura 2D). Neste protocolo, a habituação foi realizada no último dia de administração de TBT. A sessão de treino e a avaliação da memória de curto prazo foram realizadas 24 h após a última administração das soluções, e a avaliação da memória de longo prazo 48 h após a última administração. Portanto, os testes não foram concomitantes. A exploração dos objetos foi considerada pelo comportamento de tocar, cheirar e se aproximar intencionalmente

dos objetos dentro de um raio estabelecido (Antunes e Biala, 2012). Para a análise dos dados foi utilizado o índice de reconhecimento, que é calculado pela fórmula

$$\frac{TN}{(TA+TN)} \times 100,$$

onde TN é o tempo gasto para explorar o objeto novo e TA é o tempo gasto para explorar o objeto já familiar ao animal. Indivíduos com o índice de reconhecimento inferior a 60% são considerados cognitivamente afetados (Ennaceur e Delacour, 1988). O teste foi, em sua totalidade, executado e analisado por apenas um experimentador.

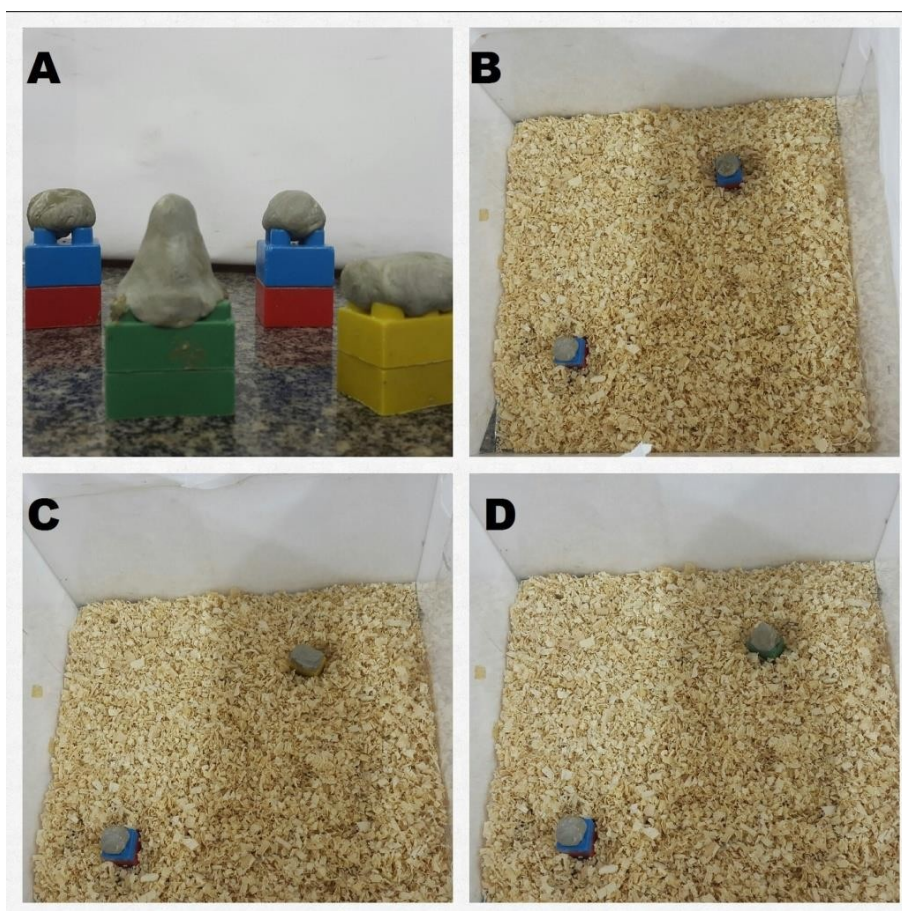


Figura 3: Esquematização do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO). (A): O teste se utiliza de 4 objetos: 2 objetos iguais (A1 e A2) e outros 2 diferentes (B1 e C1). (B): na sessão treino, o animal explora os dois objetos iguais.(C): 1h30min após a sessão treino, o objeto A2 é trocado por B1 e o animal retorna à caixa. (D): 24 h após a sessão treino, o objeto B1 é trocado por C1 e o animal retorna à caixa.

3.6 – Eutanásia

Os animais foram eutanasiados através de decapitação com tesoura, e foram retirados o córtex pré-frontal e o hipocampo, para análises bioquímicas posteriores. O material coletado foi colocado em eppendorfs e armazenado em um freezer a -80°C. Todos os animais foram sacrificados durante a fase metaestro-diestro do ciclo estral.

3.7 – Extração de proteína e Western Blot

Após a eutanásia dos animais, as regiões cerebrais foram coletadas e armazenadas em -80°C. Posteriormente, foi realizada a homogeneização a 0°C com tampão de lise contendo 250 mmol/L de sacarose, 1 mmol/L de EDTA, 20 mmol/L de 25 imidazol, pH 7.2, e os seguintes inibidores de protease: 1 mmol/L de fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil, 1 mmol/L de benzamida, 10 mg/L de leupeptina, 1 mg/L de pepstatina A, 1 mg/L de aprotinina, e 1 mg/L de quimostatina (Sigma, St. Louis, Mo., USA.), seguida da centrifugação a 10 000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensurar a concentração de proteínas totais pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Então, foi realizada a eletroforese com SDS-PAGE 10% (poliacrilamina, Sigma, St. Louis, Mo., USA) e a transferência para uma membrana de nitrocelulose (Biorad, Hercules, CA., USA). Essa membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado, 5%-PBS e incubada com anticorpos primários para receptor de estrogênio α (ER α , diluição 1:500, em 3% BSA em TBS-T, Santa Cruz Biotechnology, INC) e GAPDH (diluição 1:1000, em 3 % BSA em TBS-T, Santa Cruz Biotechnology, INC) durante toda a noite a 4 °C.No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:1000, em 3 % BSA em TBS- T, Sigma, St. Louis, Mo., USA.) por 1 hora a 4 °C. As reações foram reveladas com NBT/ BCIP (Life Technologies, Rockville, MD). As bandas foram analisadas por densitometria através de unidades densitométricas arbitrárias, pela correção com seu respectivo controle interno presente em cada gel/membrana utilizando o Programa Image J.

3.8 – Avaliação de peroxidação lipídica.

Para as análises, foram pesados 70 mg de tecido, e adicionados 200 μ L de de PBS 1x. As amostras foram homogeneizadas com sonicador e o volume final foi completado para 500 μ L. O volume foi transferido para criotubos e aos mesmos foram

adicionados 500 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico, a 1% (diluído em solução NaOH 50mM) em conjunto com 250 μ L de ácido fosfórico, a 7%. Os tubos foram colocados por 20 minutos em estufa a 100 °C. Em seguida, os criotubos foram retirados e cobertos com gelo por 10 minutos. Os volumes foram passados para microtubos de centrifugação e 300 μ L de butanol foram adicionados aos mesmos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm. A fase superior foi pipetada para placa de 96 poços em duplicata, em conjunto com uma solução contendo o branco (ácido fosfórico, HCL 1M e solução TBA, na proporção de 1:1:1). As amostras foram levadas a um leitor de placas, e a leitura foi realizada nos comprimentos de onda 532nm e 600 nm.

3.9 – Análise estatística

Para os dados do ciclo estral, foi comparada a duração média dos ciclos entre os grupos. Os dados do teste de reconhecimento de objetos foram apresentados como índice de reconhecimento, em porcentagem. Os níveis de expressão do receptor ER α forma apresentados em unidades densitométricas arbitrárias (u.d.a), e a concentração de TBARS em nmol/g. Para todas as análises, foi utilizado ANOVA de uma via para amostras independentes, seguido de teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Todos os dados foram descritos como média \pm erro padrão da média Em todas as análises, foi considerado um nível de significância para $p < 0,05$.

3 – RESULTADOS

4.1 – Ciclo Estral

Os animais tiveram os seus ciclos reprodutivos acompanhados ao longo da exposição ao TBT. Nos seis dias que precederam a administração de TBT, todos os animais apresentaram ciclos regulares, com duração de 4 a 5 dias. Esse padrão se manteve nos animais do grupo Controle, enquanto nos grupos tratados com TBT, os ciclos se mostraram desregulados, com longa duração e discrepâncias na duração das fases (Figura 4).

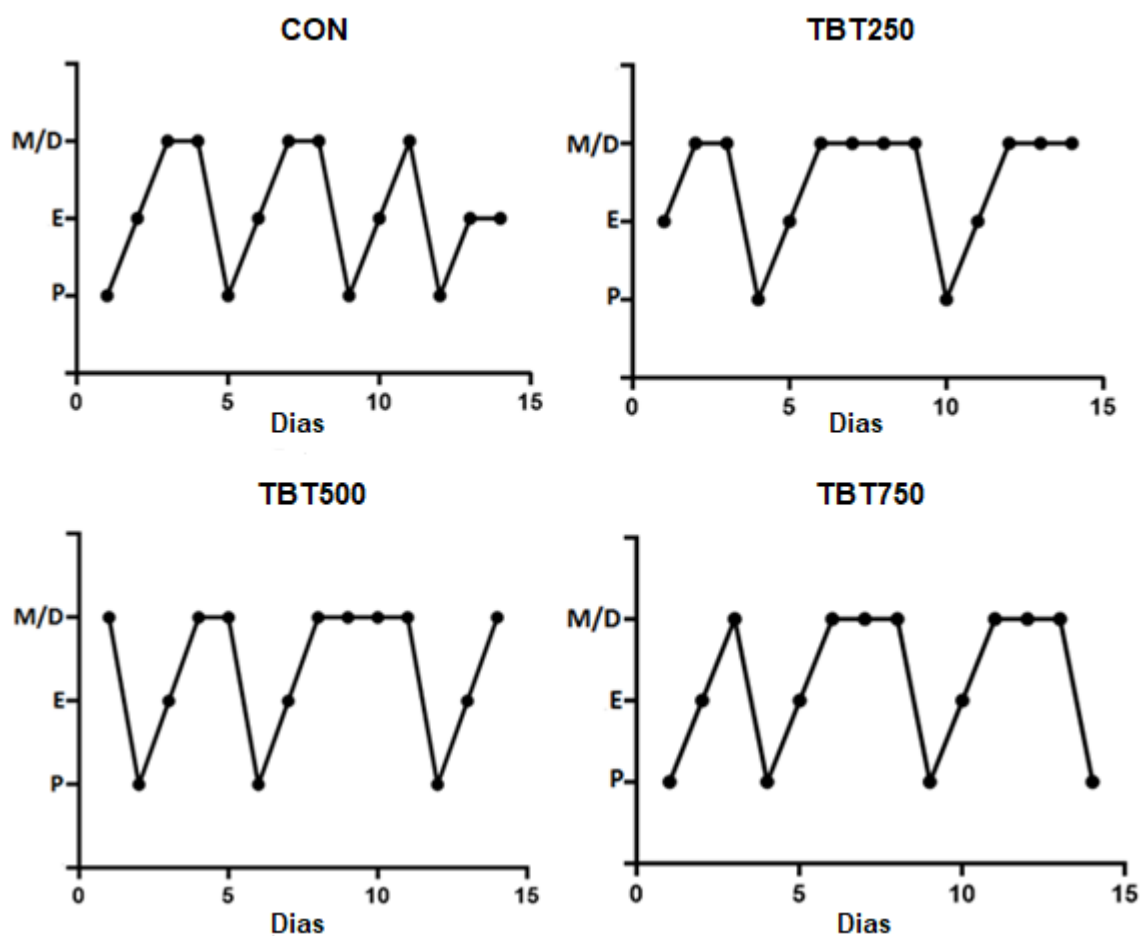


Figura 4: Representação esquemática do ciclo estral dos animais, durante 14 dias de tratamento. P: proestro; E: estro; M/D: metaestro-diestro.

Enquanto a duração média do proestro e do estro não variaram de forma significativa entre o grupo Controle e os grupos expostos ao TBT (Figura 5A-5B), observamos um aumento na duração do metaestro-diestro (Figura 5C), onde estas fases se apresentaram, em média, mais do que o dobro de dias, em relação ao controle (CON: 1.625 ± 0.2 ; TBT-250: 4.125 ± 0.6 ; TBT-500: 4.375 ± 0.4 ; TBT-750: 4.125 ± 0.5). O comprimento total dos ciclos também foi alterado nos animais que receberam TBT, onde cada ciclo reprodutivo durou, em média, 7 dias, em comparação aos animais controle que mantiveram seus ciclos com duração de 5 dias (Figura 5D).

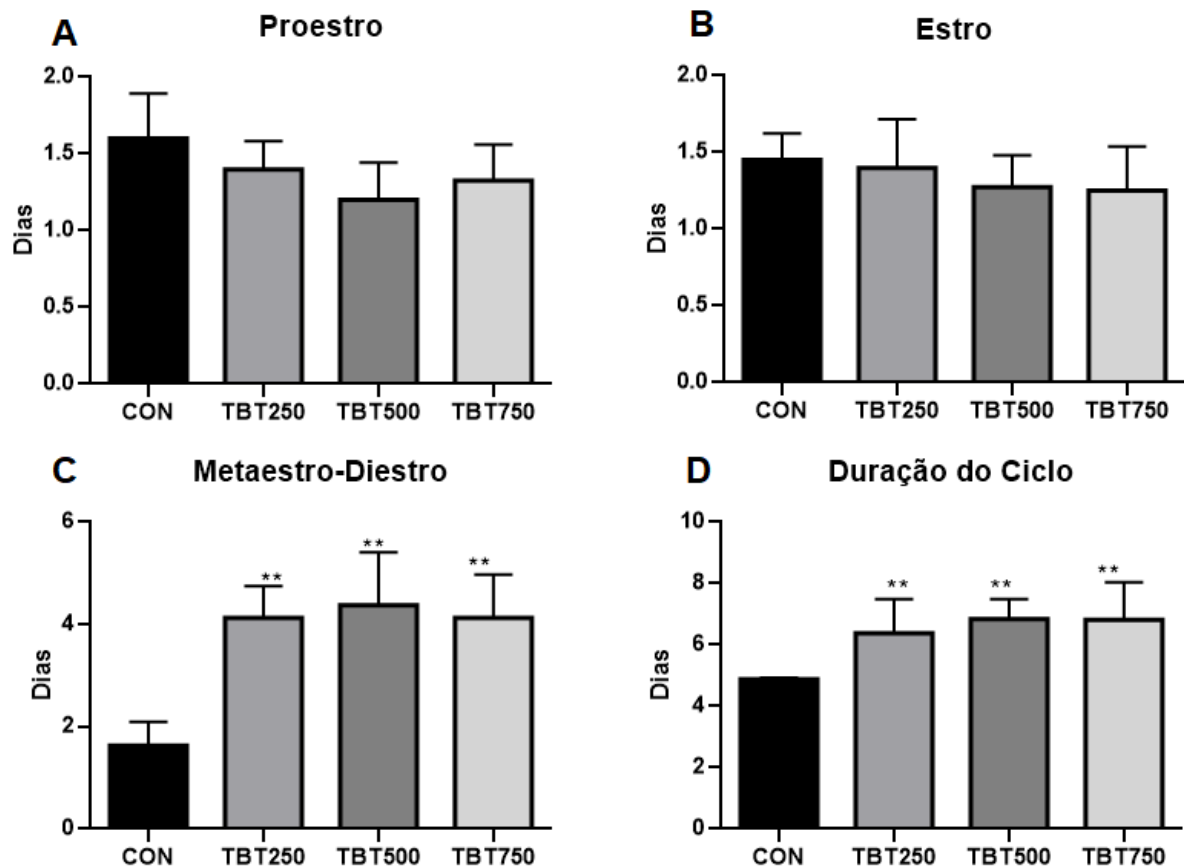


Figura 5: Comparação entre as médias da duração das fases do ciclo estral e do comprimento total do ciclo entre os grupos analisados (n = 16). (A): duração média do proestro; (B): duração média do estro; (C): duração média do metaestro-diestro; (D): duração média de um ciclo completo. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. **p < 0.01

4.2 – Níveis de expressão do receptor ER α

As amostras de córtex pré-frontal e hipocampo coletadas no primeiro experimento foram utilizadas para verificar os níveis de expressão do receptor de estrogênio ER α (u.d.a) no cérebro dos animais. Os dados obtidos mostram efeitos diferentes do TBT sendo exercidos nas duas áreas previamente citadas (Figuras 6A-6B)

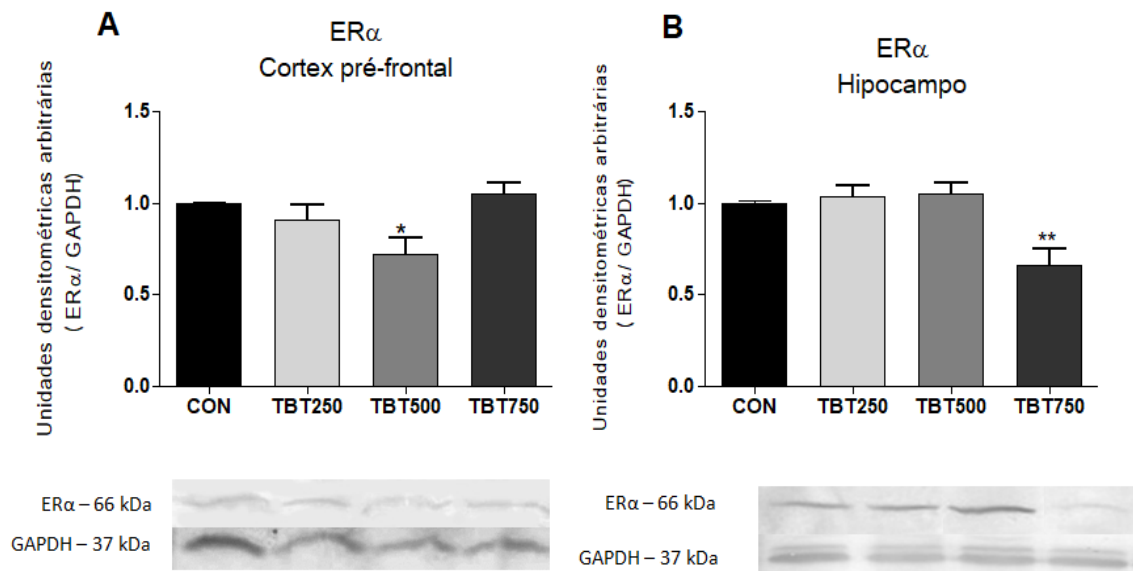


Figura 6: Níveis de expressão do receptor de estrogênio ER α após exposição ao TBT (n = 16). (A): Perfil de expressão no córtex pré-frontal. (B): Perfil de expressão no hipocampo. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. *P < 0.05; **P < 0,01

A ANOVA de uma via detectou diferenças entre os grupos de tratamento, tanto na análise do CPF [F (3, 15) = 4.840], quanto na análise do hipocampo [F (3, 11) = 8.100]. Foram detectados níveis reduzidos na expressão de ER α no CPF (0.72 ± 0.09 u.d.a) comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$), nos animais do grupo TBT500. No hipocampo, foi detectada uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão de ER α no grupo TBT750 (0.65 ± 0.08 ; $p < 0,01$), quando comparado ao Controle.

4.3 – Memória de Reconhecimento

Os animais foram submetidos a uma avaliação da memória de reconhecimento de curto (Figura 6A) e longo prazo (Figura 6B), um processo cognitivo dependente

da interação do hipocampo com o córtex pré-frontal (Warburton e Brown, 2015), após 14 dias de exposição ao TBT nas doses de 250 ng/kg, 500 ng/kg e 750ng/kg. A exposição ao TBT por 14 dias, nas doses de 250, 500 e 750ng/kg, alterou ($p < 0.05$) o desempenho dos animais no teste de reconhecimento de objetos (TRO), quando comparado com o grupo Controle. Na sessão realizada 1h30min após o treinamento (Figura 7A), de modo a avaliar a memória de reconhecimento de curto prazo, os grupos que receberam TBT não conseguiram atingir um índice de reconhecimento igual ou superior a 60%, que é o desempenho mínimo para se considerar normal a função cognitiva do indivíduo, de acordo com o paradigma de Ennaceur e Delacour (1988). Do mesmo modo, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos na avaliação da memória reconhecimento de curto prazo, quando comparados ao Controle (TBT250: $59.25 \pm 6\%$, TBT500: $44.25 \pm 10\%$, TBT750: $47.75 \pm 8\%$, $F(3, 12) = 10,30$). Em sessão realizada 24h após o treinamento (Figura 7B) os animais que receberam TBT mais uma vez não atingiram o índice de reconhecimento de 60%, enquanto o grupo Controle continuou acima desse valor, sendo detectada uma diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação aos grupos tratados (TBT250: $56.25 \pm 7\%$, TBT500: $43.75 \pm 8\%$, TBT750: $45.75 \pm 9\%$, $F(3, 12) = 7,947$)

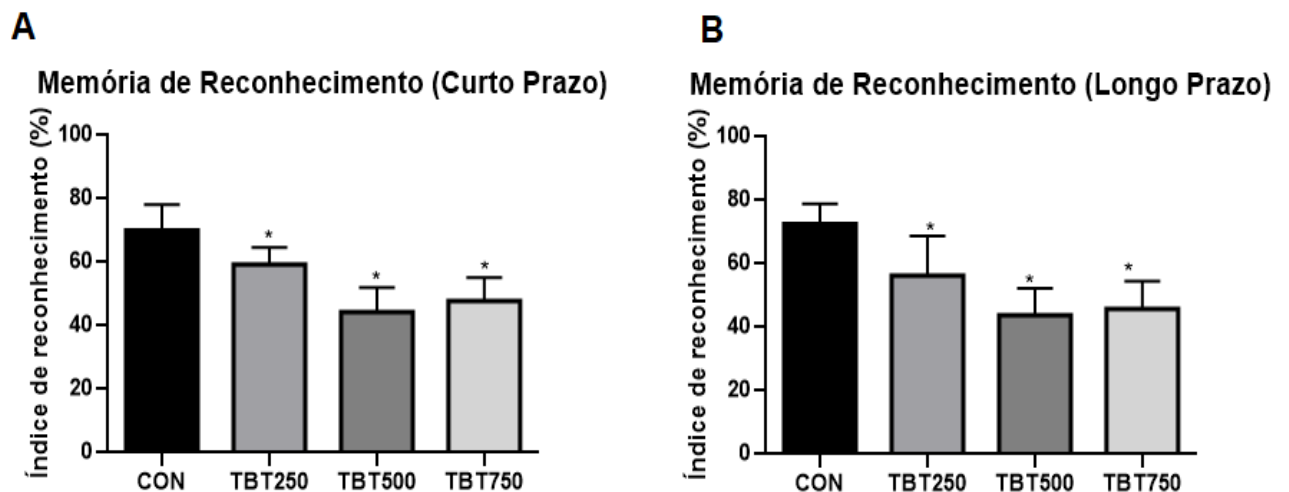


Figura 7: Avaliação da memória de reconhecimento de camundongos fêmea no Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) ($n = 48$). (A): Avaliação da memória de reconhecimento de curto prazo, realizada 1h30min após o treinamento. (B): Avaliação da memória de reconhecimento de longo prazo, realizada 24h após o treinamento. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. $*p < 0,05$

4.4 – Avaliação de peroxidação lipídica

Os tecidos coletados foram utilizados para avaliar estresse oxidativo através de TBARS. Foram detectados níveis elevados de TBARS (mmol/g) no córtex pré-frontal dos animais tratados com TBT (TBT250: 65.92 ±11.08, TBT500: 72.74 ±6.13, TBT750: 59.57 ±8.18; $p < 0.01$), quando comparados ao Controle (15.80 ±3.81; Figura 8A). Os níveis de TBARS também foram elevados no hipocampo dos animais tratados com TBT (TBT250: 50.12 ±11.65, TBT500: 53.66 ±5.94, TBT750: 60.48 ±13.14), embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa em relação ao controle (31.60 ±9.39; Figura 8B).

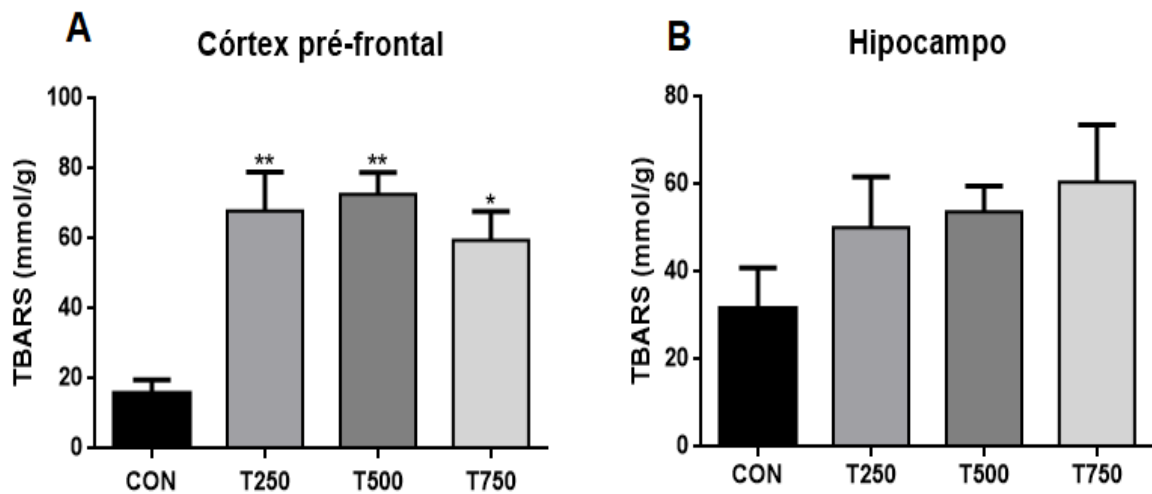


Figura 7: Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica através do ensaio TBARS (n= 16). (A): Níveis de TBARS no córtex pré-frontal. (B): Níveis de TBARS no hipocampo. ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. **:p<0.05. ***:p<0.01

4– DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram fornecidas evidências de que a exposição crônica ao TBT é capaz de interferir em comportamentos complexos de mamíferos, como a memória de reconhecimento de curto e longo prazo de camundongos fêmea, em associação com a redução da expressão proteica do receptor de estrogênio ER α , e o aumento de parâmetros associados ao estresse oxidativo, como os níveis de produtos de peroxidação lipídica. Considerando os efeitos neurotróficos e protetores do estrogênio em neurônios, uma interferência química na função endócrina pode levar à vulnerabilidade das funções cerebrais.

Os efeitos tóxicos do TBT sobre a função reprodutiva de mamíferos em ambos os sexos já foram previamente demonstrados (Podratz et al., 2012; 2015; Araújo et al., 2018). A desregulação do ciclo estral dos animais expostos ao TBT que foi demonstrada é consistente com estudos prévios encontrados na literatura. Podratz et al. (2012) mostrou uma diminuição na regularidade dos ciclos reprodutivos de ratas tratadas com TBT (100 ng/kg), durante 16 dias, juntamente com um aumento na duração do metaestro. De forma similar, ratas tratadas com homogenato de frutos do mar contaminados com TBT apresentaram um aumento significativo na duração do metaestro-diestro, assim como na duração do ciclo estral como um todo (Podratz et al., 2015). Os dados apresentados neste trabalho mostram um aumento similar na duração do ciclo estral, causado pelo aumento anormal da duração do metaestro-diestro. O ciclo estral é controlado pelos níveis sistêmicos de hormônios sexuais ovarianos, e é sabido que os níveis séricos de E₂ estão baixos durante o metaestro e voltam a aumentar apenas ao final do diestro (Walkmer et al., 1992; Boutin & Cunha, 1997). Deste modo, é possível inferir que a longa duração do metaestro-diestro encontrada nos animais tratados com TBT neste estudo é um sinal de baixos níveis de E₂, como já foi observado previamente em outros estudos (Podratz et al., 2012; 2015; Coutinho et al., 2016; Sena et al., 2017; Araújo et al., 2018).

Estrogênios têm um papel-chave na função cerebral e exercem influência sobre processos neurobiológicos como neuroproteção e cognição (Garcia-Segura et al., 2001; Marin et al., 2003; Arevalo et al., 2015; Tang et al. 2018), e é possível sugerir que a exposição a desreguladores endócrinos, como o TBT, possa ter repercussões sobre o comportamento, como a literatura demonstra em relação a outros compostos

interferentes endócrinos, como bisfenol A, etinilestradiol e bifenilas policloradas (Sobolewski et al., 2014; Reilly et al., 2015; Wang et al., Zaccaroni et al., 2016). A regulação da memória por estrogênios é bem descrita, e estudos prévios apontam que é necessária uma concentração ótima de estrogênio para um desempenho cognitivo adequado, em que até mesmo alterações de menor grau nos níveis hormonais podem causar distúrbios no comportamento e em vias moleculares envolvidas em sua execução, tais como vias de sinalização de neurotransmissores, como o glutamato, e cascatas intracelulares, como a via ERK (Barha & Galea, 2010; Boulware et al., 2013; Duterte-Guterman et al., 2015; Frick et al., 2018). Fernandes et al. (2008) demonstraram que a injeção intraperitoneal de estrogênio aumenta os níveis da proteína ERK fosforilada no hipocampo dorsal de ratas ovariectomizadas e melhora a retenção de memória após a sessão de treino no teste de reconhecimento de objetos. Os efeitos do E₂ não apenas são encontrados em nível molecular, mas também são observadas mudanças na morfologia neuronal, como demonstrado através do aumento do número de espinhas dendríticas, e por consequência, o número de sinapses, causados pelo tratamento com E₂ em camundongos fêmea c57/BL6 ovariectomizadas (Li et al., 2004).

Embora o TBT seja um clássico inibidor da aromatase, seus efeitos sobre os receptores de estrogênio e atividade estrogênica como um todo são controversos na literatura. Alguns dados obtidos *in vitro* mostram que o TBT e outros organoestânicos causam aumento na expressão de receptores de estrogênio e na sinalização estrogênica, quando em baixas doses (Sharan et al., 2013; Botelho et al., 2015). Não obstante, muitos estudos apontam na direção oposta, reportando que o TBT reduz os níveis de estrogênio e a expressão subsequente de receptores de estrogênio e vias intracelulares estrogênicas em modelos *in vivo* (Bertuloso et al., 2015; Sena et al., 2017). Em um modelo *in vitro* contendo o domínio ligante do receptor de estrogênio humano, uma concentração muito baixa de hidróxido de tributilestanho (TBT-OH) foi capaz de atuar como um inibidor da atividade transcripcional dependente de E₂, similar a antagonistas clássicos como o 4-hidroxitamoxifeno (Cho et al., 2012). Estas evidências estão alinhadas com os nossos achados, onde os dados indicam e o TBT é capaz de induzir alterações neuroendócrinas em nível proteico, ao diminuir a expressão de ER α em regiões do cérebro relacionadas com processos cognitivos em diferentes doses, possivelmente

interferindo na neuroproteção mediada por estrogênio. Para nosso conhecimento, esta é a primeira evidência de que o TBT interfere nos receptores estrogênio em áreas do cérebro relacionadas com memória, *in vivo*.

Desreguladores endócrinos notoriamente causam alterações comportamentais em modelos experimentais, de forma que tem sido utilizado o termo “desreguladores neuroendócrinos” para definir a atividade de certos xenobióticos (Leon-Olea et al., 2014). A literatura mostra que o TBT vem sendo incluído nesse grupo de substâncias, com diversos estudos sobre seus efeitos comportamentais sendo realizados. A exposição ao TBT foi capaz de suprimir os comportamentos reprodutivos das fêmeas do peixe *Danio rerio*, nas concentrações de 100 ng/L e 500 ng/L (Xiao et al. 2018). Nessa mesma espécie, o TBT reduziu a atividade locomotora de indivíduos expostos durante o período embrionário (Liang et al., 2017). Em outras espécies de peixe, o TBT apresentou atividade ansiogênica (Zhang et al., 2016a), aumentou a ingestão de alimentos (Zhang et al. 2016b), e foi capaz de afetar o comportamento predatório (Yu et al., 2013). A maior parte dos estudos a respeito da toxicologia comportamental do TBT é realizada em peixes e outros modelos experimentais aquáticos, e são poucas as investigações referentes aos efeitos do TBT sobre o comportamento de mamíferos. Si et al. (2011) mostrou que o TBT foi capaz de influenciar a aversão por altura em filhotes de camundongos, os quais as mães foram expostas às doses de 10µg/kg e 100µg/kg, sendo este um sinal comportamental de ansiedade.

Os dados obtidos neste trabalho fornecem fortes evidências de interferência do TBT em processos cognitivos, mostrando que a memória de reconhecimento, em curto e longo prazo, é afetada nos animais tratados, quando comparada ao grupo controle. Todas as doses foram capazes de diminuir o desempenho no teste de reconhecimento de objetos, incluindo a dose abaixo do nível considerado seguro. Esta é a primeira vez, em nosso conhecimento, de que foi demonstrado que o TBT é capaz de causar déficits cognitivos na memória de roedores. Como foi mencionado previamente, o TBT atua como um inibidor da aromatase, e substâncias com essa propriedade afetam a memória e causam alterações comportamentais mesmo quando usadas com propósito farmacológico, como foi observado com o letrozol, um

inibidor da aromatase amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama (Bian et al., 2014; Kokras et al., Rosenfeld et al., 2018; Gervais et al., 2019)

Pereira et al. (2014) obtiveram dados que apoiam a hipótese de que a memória de reconhecimento é regulada pelo E_2 em camundongos fêmeas através de $ER\alpha$, com resultados similares provenientes também de outros grupos (Frye et al., 2007; Phan et al., 2011). Embora as doses que produziram prejuízos na memória de reconhecimento não foram capazes de alterar os níveis de $ER\alpha$ no cérebro, essa é uma importante via a ser investigada mais a fundo para entender a toxicidade neuronal e comportamental do TBT e outros organoestânicos. De fato, o estrogênio foi capaz de reverter danos cognitivos causados por TMT, um organoestânico muito similar ao TBT (Marchese et al., 2018). A interferência ocasionada pelo TBT nos efeitos do E_2 em nível sistêmico, e sua subsequente interferência nos receptores $ER\alpha$ em áreas do cérebro ligadas a cognição, como foi demonstrado neste estudo, podem ser responsáveis por seu efeito adverso na memória de reconhecimento de objetos que foi aqui observado. A infusão de agonistas de $ER\alpha$ no hipocampo dorsal aumentou a função da memória de reconhecimento de objetos em camundongos fêmeas de modo ERK-dependente (Boulware et al. 2013), demonstrando que o $ER\alpha$ influencia a memória através da rápida ativação da sinalização celular no hipocampo.

É importante notar que, em geral, organoestânicos não tem uma curva dose-resposta bem descrita para vários efeitos biológicos (Champ & Seligman, 2012), de modo que a relação dose-resposta entre o TBT e expressão de $ER\alpha$ no cérebro não é completamente compreendida, sendo incerto por que uma dose mais baixa do composto reduziu a expressão de $ER\alpha$ no córtex pré-frontal, mas uma dose mais alta, não. A diferença na resposta entre córtex pré-frontal e hipocampo também é intrigante. É notório que o hipocampo tem a capacidade de sintetizar estrogênios *de novo* (Kimoto et al., 2001; Kretz et al., 2004; Ishii et al., 2007; Hojo et al., 2008; Srivastava et al., 2013), sendo razoável assumir que esse é um dos fatores capazes de influenciar os efeitos diferenciais do TBT entre regiões do cérebro, como foram demonstrados neste estudo. Estudos usando modelos animais não mamíferos mostraram que o TBT foi capaz de bloquear a síntese de neuroesteróides e diminuir

ambas as expressões do gene citocromo p450 aromatase e atividade geral da aromatase expressa e suas isoformas (Lyssimachou et al. 2006; Tian et al., 2015).

Estudos prévios demonstraram que o TBT induz toxicidade por estresse oxidativo em vários tecidos, como por exemplo, músculo cardíaco e artérias (Ximenes et al. 2017; Pereira et al. 2019); fígado, rins e testículos (Kanimozhi et al. 2016; Coutinho et al. 2016) e cérebro (Ishihara et al. 2012; 2014; Mitra et al. 2013). Dadas as capacidades neuroprotetoras do estrogênio previamente citadas, o tecido cerebral poderia estar mais vulnerável a danos sob os efeitos de desregulador endócrino do TBT, o que pode levar a déficits de memória. Ishihara e colegas (2012) reportaram que o estrogênio é capaz de reverter dano oxidativo induzido por TBT em fatias de hipocampo. Dano direto do TBT em áreas relacionadas a memória e aprendizagem, em combinação com desregulação dos níveis de estrogênio e expressão do receptor ER α podem ser uma potencial causa de alterações comportamentais.

Hipocampo e estriado são áreas particularmente vulneráveis ao dano oxidativo causado pelo TBT. Mitra et al. (2015) demonstrou que o TBT desregula a homeostase de metais e a geração espécies reativas de oxigênio, e causa elevados níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no hipocampo. Enquanto nossos dados não mostram aumento significativo na peroxidação lipídica no hipocampo de ratos tratados com TBT, nós observamos que o córtex pré-frontal foi severamente afetado pela exposição ao TBT. De forma similar, Mitra et al. (2013) também observou aumento nos níveis de metais pró-oxidativos, como ferro e cobre, aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, e dano oxidativo, como carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica, no córtex cerebral de ratos machos tratados com TBT. O estresse oxidativo induzido por TBT também pode causar ativação de astrócitos no córtex cerebral de ratos (Mizunashi et al. 2000), o que aponta para dano cortical ainda mais extenso e neuroinflamação. Nosso estudo, contudo, é o primeiro que investigou e demonstrou dano oxidativo especificamente no córtex pré-frontal, uma região do cérebro crucial para comportamentos complexos em mamíferos. A memória de reconhecimento é conhecida por ser dependente da atividade do córtex pré-frontal (Tuscher et al., 2018) dado que a interferência na interação entre hipocampo e córtex pré-frontal

leva a alterações cognitivas (Preston & Einchenbaum, 2013; Warburton & Brown, 2015; Einchenbaum, 2017).

Existem evidências contundentes que indicam que os processos de proteção contra danos cerebrais são modulados diretamente via ER α , o que corrobora a nossa hipótese de que as alterações no perfil de expressão desse receptor estão relacionadas com o dano oxidativo encontrado. Deleção do gene para ER α em camundongos *knockout* extingue completamente as ações neuroprotetoras do E₂ em todas as regiões do cérebro (Dubal et al. 2001). A mediação das funções protetoras do E₂ por meio da ativação do ER α não se dá apenas na via de ação direta nos neurônios, mas também pela ativação destes receptores nos astrócitos (Spence et al., 2011), demonstrando a complexidade da fisiologia deste processo. No que se refere especificamente à função protetora da sinalização via ER α sobre o estresse oxidativo, a literatura mostra que esse receptor está diretamente envolvido na sobrevivência de células neuronais sob estresse oxidativo devido à excitotoxicidade glutamatérgica (Mize et al., 2003) e toxicidade β -amilóide (Fitzpatrick et al., 2002). Em modelos *in vivo*, é demonstrado que a ativação do ER α inibe a enzima NADPH-oxidase e atenua o estresse oxidativo no cérebro de ratas ovariectomizadas (Zhang et al. 2009), além de reduzir os níveis de peroxidação lipídica induzida pelo etanol (Ramezani et al. 2011).

Analisando do ponto de vista cognitivo, alguns estudos reforçam a ideia de que o estresse oxidativo é uma das possíveis vias de atuação da toxicologia comportamental de diversos contaminantes químicos. O glifosato, um herbicida altamente tóxico, alterou a memória de reconhecimento e induziu estresse oxidativo no tecido cerebral de camundongos em dois modelos de tratamento, tanto subcrônico quanto crônico (Bali et al., 2019). Alterações concomitantes em marcadores de estresse oxidativo, como as enzimas glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e em comportamentos como memória espacial e ansiedade, foram encontradas em ratas expostas a uma mistura de poluentes orgânicos (Lahouel et al. 2016). O metilmercúrio, um poluente ambiental organometálico, assim como o TBT, é capaz de alterar a aquisição de memória em ratos, em combinação com o aumento dos níveis de peroxidação lipídica no cérebro (Leão et al., 2017).

Portanto, levando em conta as evidências citadas, a indução pelo TBT, de modificações na expressão do receptor ER α , e suas vias de sinalização consequentes, são a provável causa tanto dos déficits de memória encontrados, tanto pelo dano oxidativo no CPF, sendo este último, por si só, mais um fator relacionado à redução do desempenho cognitivo em roedores. Desta forma, uma dupla ação do TBT, tanto como desregulador endócrino, quanto como toxicante direto, o torna especialmente perigoso para o sistema nervoso de mamíferos, ao aumentar a vulnerabilidade de diferentes regiões do cérebro ao estresse oxidativo, ao interferir nos processos neuroendócrinos de proteção, e ao mesmo tempo, promover alterações na modulação estrogênica da função cognitiva.

5 – CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a exposição crônica ao TBT está relacionada com alterações no sistema nervoso, endócrino e reprodutivo de mamíferos, causando alterações na regularidade dos ciclos reprodutivos de camundongos fêmeas; promovendo alterações comportamentais, como foi exemplificado pela queda no desempenho cognitivo, na memória de reconhecimento de curto e longo prazo; levando a mudanças no perfil de expressão proteica de receptores de estrogênio ER α no cérebro destes animais e acarretando dano oxidativo, por meio de peroxidação lipídica, no córtex pré-frontal.

Ahmad, M. S., Mirza, B., Hussain, M., Hanif, M., Ali, S., Walsh, M. J., Martin, F. L. ATR-FTIR spectroscopy detects alterations induced by organotin(IV) carboxylates in MCF-7 cells at sub-cytotoxic/-genotoxic concentrations. *PMC Biophysics*. v.1, p. 3. 2008. doi: 10.1186/1757-5036-1-3

Almeida, A. C., Wagener, A. d. L. R., Maia, C. B. and Miekeley, N. Speciation of organotin compounds in sediment cores from Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil) by gas chromatography–pulsed flame photometric detection. *Applied Organometallic Chemistry*. v. 18, p. 694–704. 2004. doi: 10.1002/aoc.661

Almey, A., Milner, T. A., Brake, W. G. Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Hormones and Behavior*. v. 17 p. 125–138. 2015. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.010

Antunes, M., Biala, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*. v. 13(2), p. 93-110. 2011. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z

Araújo, J.F.P., Podratz, P.L., Sena, G.C., Merlo, E., Ceotto, L. Ayub, J.G.M., Pereira, A.F.Z., Santos-Silva, A.P., Miranda-Alves, L., Silva, I.V., Graceli, J.B. The Obesogen Tributyltin Induces Abnormal Ovarian Adipogenesis in Adult Female Rats. *Toxicology Letters*. v. 295, p. 99-114 2018. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.06.1068.

Arevalo, M.A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M.. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews Neuroscience*. v. 16(1), p. 17-29. 2015. doi: 10.1038/nrn38562015

Artifon, V., Castro, I., Fillmann, G. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environmental Science Pollution*. v. 23, p. 16047–16055. 2016. doi: 10.1007/s11356-016-6745-7

Bailey, M., Wang, A. C. J., Hao, J., Janssen, W. G. M., Hara, Y., Dumitriu, D., Morrison, J. H. Interactive Effects of Age and Estrogen on Cortical Neurons: Implications for Cognitive Aging. *Neuroscience*. v.191, p. 148–158. 2011. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.045.

Bali, Y.A., Kaikai, N.E., Ba-M'hamed, S., Bennis, M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology*. v. 415, p. 18-25. doi: 10.1016/j.tox.2019.01.010.

Barha, C.K., Galea, L. A. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1800(10), p. 1056-67. 2010. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.01.006.

Baulieu, E.E., Robel, P., Schumacher, M. Neurosteroids: beginning of the story. *International Review of Neurobiology*. v. 46, p. 1–32. 2001. doi: 10.1016/S0074-7742(01)46057-0

Bertuloso, B.D., Podratz, P.L., Merlo, E., de Araújo, J.F., Lima, L.C., de Miguel, E.C., de Souza L.N., Gava, A.L., de Oliveira, M., Miranda-Alves, L., Carneiro, M.T., Nogueira, C.R., Graceli, J.B. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. *Toxicology Letters*. v. 235(1), p. 45-59. 2015. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.03.009.

Bian, C., Zhao, Y., Guo, Q., Xiong, Y., Cai, W., Zhang, J. Aromatase inhibitor letrozole downregulates steroid receptor coactivator-1 in specific brain regions that primarily related to memory, neuroendocrine and integration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v.141. p. 37-43. 2014. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.12.020.

Blunden, S. J., Evans, C. J. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol III. Springer-Verlag: Berlin. 1990.

Botelho, G., Bernardini, C. Zannoni, A., Ventrella, V., Bacci, M.L., Forni, M. Effect of tributyltin on mammalian endothelial cell integrity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. v.176–177. p. 79-86. 2015. dOI 10.1016/j.cbpc.2015.07.012.

Bouldin, T. W., Goines, N. D., Bagnell, R. C., Krigman, M. R. Pathogenesis of trimethyltin neuronal toxicity. Ultrastructural and cytochemical observations. *American Journal of Pathology*. v. 104(3), p. 237–249. 1981.

Boulware, M.I., Heisler, J.D., Frick, K.M. The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. *Journal of Neuroscience*. v. 33, p. 15184–15194. 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1716-13.2013.

Boutin, E. L., Cunha, G. R. Estrogen-induced epithelial proliferation and cornification are uncoupled in sinus vaginal epithelium associated with uterine stroma. *Differentiation* v. 62, p. 171–78. 1997. doi: 10.1046/j.1432-0436.1998.6240171.x

Champ, M.A., Seligman, P.F. Organotin: Environmental fate and effects. Chapter 29. p. 601-612. 1996. doi: 10.1007/978-94-009-1507-7

Chien, L. C.; Hung, T.C.; Chaoang, K. Y. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd e As, for fishermen in Taiwan. *Science of the Total Environmental*, v. 285, p. 117-185, 2002.

Cho, E.M., Lee, H.S., Moon, J.S., Kim, I.S., Sim, S. Ohta, A. Organotin compounds act as inhibitor of transcriptional activation with human estrogen receptor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 22(3), p. 378-84. 2012.

Chopra, V., Harley, K., Lahiff, M., Eskenazi, B. Association between phthalates and attention deficit disorder and learning disability in U.S. children, 6-15 years. *Environmental Research*, v. 128, p. 64-69. 2013. doi: 10.1016/j.envres.2013.10.004

Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*. v. 101(5), p. 378-84. 1993. doi: 10.1289/ehp.93101378

Coutinho, J.V., Freitas-Lima, L.C., Freitas, F.F., Freitas, F.P., Podratz, P.L., Magnago, R.P., Porto M.L., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Brandão, P.A., Carneiro, M.T., Paiva-Melo, F.D., Miranda-Alves, L., Silva, I.V., Gava, A.L., Graceli, J.B. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. *Toxicology Letters*. v. 260. p. 52-69. 2016. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.08.007.

Donner, N.C., Lowry, C.A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *European Journal of Physiology*. v. 465, p. 601. 2013. doi:10.1007/s00424-013-1271-7E

Duarte-Guterman P., Yagi S., Chow C., Galea L.A. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Hormones and Behavior*. v. 74, p. 37-52. 2015. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.05.024.

Dubal, D. B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S. W., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Kindy, M. S., Wise, P. M. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 98(4), p. 1952-1957. 2001. doi: 10.1073/pnas.041483198.

Eckel, L.A. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiology & Behavior*. v. 104(4), p. 517-524. 2011. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.014.

Elsworth, J.D., Jentsch, J.D., Groman, S.M., Roth, R.H., Redmond, E.D. Jr, Leranth C. Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys. *Journal of Comparative Neurology*. v. 523(8), p. 1248-1257. 2015. doi: 10.1002/cne.23735.

Eichenbaum, H. Prefrontal - hippocampal interactions in episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*. v. 18 .p. 547. 2017. doi: 10.1038/nrn.2017.74

EPA. Toxicological Review: Tributyltin Oxide (CAS No 56-35-9) in Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 1997.

Ennaceur, A., Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*. v. 31 (1), p. 47-59. 1988. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-X.

Ennaceur, A., One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioral Brain Research*, v. 215(2), p. 244-254. 2010. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.036

Evans, S. M., Seas at the millennium: An environmental evaluation. *Marine antifoulants*, Vol. III: Global issues and processes, p. 247–256, Elsevier Science Ltd, Oxford. 2000.

Farina, M., Aschner, M., Rocha, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 256(3), p. 405-417. 2011. doi: 10.1016/j.taap.2011.05.001.

Fernandez, S.M., Lewis, M.C., Pechenino, A.S., Harburger. L.L., Orr, P.T., Gresack, J.E. Estradiol induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal ERK activation and membrane-bound estrogen receptors. *Journal of Neuroscience*. v, 28, p. 8660–8667. 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1968-08.2008.

Ferraz da Silva, I, Freitas-Lima, L.C., Graceli, J.B., Rodrigues, L.C.M. Organotins in Neuronal Damage, Brain Function, and Behavior: A Short Review. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. v. 8, p. 366. 2018; doi:10.3389/fendo.2017.00366

Fitzpatrick, J. L., Mize, A. L., Wade, C. B., Harris, J. A., Shapiro, R. A., Dorsa, D. M. Estrogen-mediated neuroprotection against β -amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor α or β and activation of the MAPK pathway. *Journal of Neurochemistry*, v. 82, p. 674-682. 2002. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01000.x

Frick, K. M., Fernandez, S. M., Harburger, L. L. A New Approach to Understand the Molecular Mechanisms Through Which Estrogens Affect Cognition. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1800(10), p.1045–1055. 2010. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.11.004.

Frye, C.A., Duffy, C.K., Walf, A.A. Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiology of Learning and Memory*. v. 88, p. 208–216. 2007. doi: 10.1016/j.nlm.2007.04.003

Gallo, A., Tosti, E. Adverse Effect of Antifouling Compounds on the Reproductive Mechanisms of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Marine Drugs*. v. 11(9), p.3554-3568. 2013. doi: 10.3390/md11093554.

Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. v. 63(1), p. 29-60. 2001. doi: 10.1016/S0301-0082(00)00025-3

Gervais N.J., Remage-Healey L., Starrett J.R., Pollak D.J., Mong J.A., Lacreuse A. Adverse Effects of Aromatase Inhibition on the Brain and Behavior in a Nonhuman Primate. *Journal of Neuroscience*.v. 39(5), p; 918-928. 2018. doi: 10.1523/jneurosci.0353-18.2018

Gibbs, P. E., 1993. A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favouring survival in a TBT-polluted area, *Journal of the Marine Biological Association, UK*. v. 73, p. 667–678.1993. doi: 10.1007/BF00353267

Grote, K.; Stahlschmidt, B.; Talsness, C. E.; Gericke, C.; Appel, K. E.; Chahoud, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* . v. 202, p.145–158. 2004. doi:10.1016/j.tox.2004.05.003

Hajszan, T., Milner, T. A., & Leranth, C. Sex steroids and the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*. v. 163, p. 399-415. 2007. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63023-4.

Hoch, M. Organotin Compounds in the Environment—An Overview. *Applied Geochemistry*. v. p. 16, 719-743. 2001. doi: 10.1016/S0883-2927(00)00067-6

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., et al. Estrogen synthesis in the brain—Role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 290 (1-2), p. 31-43, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.017>.

Inagaki, T., Gautreaux, C., & Luine, V. Acute Estrogen Treatment Facilitates Recognition Memory Consolidation and Alters Monoamine Levels in Memory-Related Brain Areas. *Hormones and Behavior*, v. 58(3), p. 415–426. 2010. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.05.013.

International Maritime Organization (IMO). Safety Of Life At Seas (SOLAS) Convention, Amendments to Ch. IX. 1994

Ishihara, Y., Kawami, T., Ishida, A., Yamazaki, T. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochemistry International*. v. 60(8), p. 782- 790. 2012. doi: 10.1016/j.neuint.2012.03.004.

Ishihara, Y., Fujitani, N., Kawami, T., Adachi, C, Ishida, A., Yamazaki, T. Suppressive effects of 17 β -estradiol on tributyltin-induced neuronal injury via Akt activation and subsequent attenuation of oxidative stress. *Life Science*. v. 99(1-2), p.24-30. 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.061

Ishii, H., Tsurugizawa, T., Ogiue-Ikeda, M., Asashima, M., Mukai, H., Murakami, G., Hojo, Y., Kimoto, T., Kawato, S. Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscientist*. v. 13, p. 323–334. 2007. doi: 10.1177/10738584070130040601

Jordão, R., Casas, J., Fabrias, G., Campos, B., Piña, B., Lemos, M. F. L., Barata, C. Obesogens beyond Vertebrates: Lipid Perturbation by Tributyltin in the Crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives*. v. 123(8), p. 813–819. 2015. doi: 10.1289/ehp.1409163.

Kannan, K.; Tanabe, S.; Iwata, H.; Tatsukawa, R. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. *Environmental pollution*, v. 90, p. 279- 290, 1995. doi: 10.1016/0269-7491(95)00028-P

Kanimozhi, V., Palanivel, K., Akbarsha, M.A., Kadalmani, B. Tributyltin-mediated hepatic, renal and testicular tissue damage in male Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): a study on impact of oxidative stress. *SpringerPlus*. v. 5(1), p. 1523. 2016. doi: 10.1186/s40064-016-3186-1

Kimoto, T., Tsurugizawa, T., Ohta, Y., Makino, J., Tamura, H., Hojo, Y., Takata, N., Kawato, S. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-d-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology*. v. 142, p. 3578–3589. 2001. doi: 10.1210/endo.142.8.8327

Kokras N., Pastromas N., Papisava D., de Bournonville C., Cornil C.A., Dalla C. Sex differences in behavioral and neurochemical effects of gonadectomy and aromatase

inhibition in rats. *Psychoneuroendocrinology*. v. 87, p. 93-107. 2018. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.10.007.

Kolb, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Research*. v. 320, p. 65–98. 1984. doi: 10.1016/0165-0173(84)90018-3

Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., Rune, G.M. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *Journal of Neuroscience*. v. 24, p. 5913–5921. 2004. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004

Krüger, K., Diepgrond, V., Ahnefeld, M., Wackerbeck, C., Madeja, M., Binding, N., Musshoff, U. Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels by trimethyltin chloride. *British Journal of Pharmacology*, v.144(2), p. 283–292. 2005. doi: 10.1038/sj.bjp.0706083.

Lahouel, A., Kebieche, M., Lakroun, Z., Rouabhi, R., Fetoui, H., Chtourou, Y., Djamil, Z., Soulimani, R. Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 23(19), p. 19030-1940. 2016. . doi: 10.1007/s11356-016-6913-9.

Leão, L.K.R., Herculano, A.M., Maximino, C., Brasil Costa, A., Gouveia, A. Jr, Batista, E.O., Rocha, F.F., Crespo-Lopez, M.E., Borges, R., Oliveira, K. *Mauritia flexuosa* L. protects against deficits in memory acquisition and oxidative stress in rat hippocampus induced by methylmercury exposure. *Nutritional Neuroscience*. v. 20(5), p. 297-304. 2017. doi: 10.1080/1028415X.2015.1133030.

León-Olea, M., Martyniuk, C. J., Orlando, E. F., Ottinger, M. A., Rosenfeld, C., Wolstenholme, J., Trudeau, V. L. Current concepts in neuroendocrine disruption. *General and Comparative Endocrinology*. v. 203, p. 158-173. 2014. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.02.005.

Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, et al. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Science of*

the United States of America. v. 101, p. 2185–2190. 2004. doi: 10.1073/pnas.0307313101.

Liang, X., Souders, C.L., Zhang, J., Martyniuk, C.J. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. *Chemosphere*, v. 189, p. 498-506. 2017. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.093.

Lo, S.; Allera, A.; Albers, P.; Heimbrecht, J.; Jantzen, E.; Klingmuller, D.. Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 84, p. 569-576. 2003. doi: 10.1016/S0960-0760(03)00074-8

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. v. 193(1), p. 265-275. 1951

Lyssimachou M., Jenssen B. M., Arukwe A. Brain Cytochrome P450 Aromatase Gene Isoforms and Activity Levels in Atlantic Salmon After Waterborne Exposure to Nominal Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol and Antifoulant Tributyltin, *Toxicological Sciences*. v. 91(1), p. 82-92 .2006. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj136>

Lyssimachou, A., Santos, J. G., André, A., Soares, J., Lima, D., Guimarães, L., Santos, M. M. The Mammalian “Obesogen” Tributyltin Targets Hepatic Triglyceride Accumulation and the Transcriptional Regulation of Lipid Metabolism in the Liver and Brain of Zebrafish. *PLoS ONE*, v.10(12). 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0143911.

Maciel, D.C., Castro, Í.B., de Souza, J.R.B., Yogui, G.T., Fillmann, G., Zanardi-Lamardo, E., Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*. v. 126, p. 473–478. 2018. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.11.061

Marchese, E., Corvino, V., Di Maria, V., Furno, A., Giannetti, S., Cesari, E., Lulli, P., Michetti, F., Geloso, M. C. (2018). The Neuroprotective Effects of 17 β -Estradiol

Pretreatment in a Model of Neonatal Hippocampal Injury Induced by Trimethyltin. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 385. doi:10.3389/fncel.2018.00385

Marin R., Guerra B., Hernández-Jiménez J.G., Kang X.L., Fraser J.D., López F.J., Alonso R. Estradiol prevents amyloid-beta peptide-induced cell death in a cholinergic cell line via modulation of a classical estrogen receptor. *Neuroscience*. v. 121 (4). p. 917-926. 2003. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00464-0.

Milles, D. History of Toxicology. *Toxicology - Chapter 1, Academic Press*. p. 11-23. 1999. doi: 10.1016/B978-012473270-4/50060-2.

Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. v. 144, p. 2055–67. 2003. doi: 10.1210/en.2002-221069

Mitra, S., Gera, R., Siddiqui, W.A., Khandelwal, S. Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood-brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: an in vivo and in vitro study. *Toxicology*. v. 310, p. 39-52. 2013. doi: 10.1016/j.tox.2013.05.011.

Mitra, S., Siddiqui, W.A., Khandelwal, S. Early cellular responses against tributyltin chloride exposure in primary cultures derived from various brain regions. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 37(3), p. 1048-59. 2014. doi: 10.1016/j.etap.2014.03.020.

Mitra, S., Siddiqui, W.A., Khandelwal, S. Differential susceptibility of brain regions to tributyltin chloride toxicity. *Environmental Toxicology*. v. 30(12), p. 1393-405. 2015. doi: 10.1002/tox.22009.

Mize, A.L., Shapiro, R.A., Dorsa, D.M. Estrogen Receptor-Mediated Neuroprotection from Oxidative Stress Requires Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Endocrinology*. v. 144 (1), p. 306–312, 2003. doi: 10.1210/en.2002-220698

Mosquera, L., Colón, J. M., Santiago, J. M., Torrado, A. I., Meléndez, M., Segarra, A. C., Miranda, J. D. Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen

receptor alpha. *Brain Research*, v. 1561, p. 11–22. 2014. doi: 10.1016/j.brainres.2014.03.002

Munetsuna, E., Hattori, M., Yamazaki, T. Stimulation of estradiol biosynthesis by tributyltin in rat hippocampal slices. *Endocrinology Research*. v. 39(4), p.168-72. 2014. doi: 10.3109/07435800.2013.875563.

Nelson, J.F.; Felicio, L.S.; Randall, P.K.; Sims, C.; Finch, C.E. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biology of reproduction*, v. 27, p. 327-339, 1982.

Nilsen, J., Chen, S., Irwin, R. W., Iwamoto, S., Brinton, R. D. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neuroscience*. v. 7, p. 74. 2006. doi: 10.1186/1471-2202-7-74

Omura ,M., Ogata, R., Kubo, K., Shimasaki, Y, Aou, S., Oshima, Y. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. *Toxicological Sciences*. v. 64, p. 197–224. 2001. doi:10.1093/toxsci/64.2.224

Pereira, L.M., Bastos, C.P., de Souza, J.M., Ribeiro, F.M., Pereira, G.S.. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor alpha. *Neurobiology of Learning and Memory*. v.114, p. 1–9. 2014. doi: 10.1016/j.nlm.2014.04.001

Phan, A., Lancaster, K.E., Armstrong, J.N., MacLusky, N.J., Choleris, E. Rapid effects of estrogenreceptor alpha and beta selective agonists on learning and dendritic spines in female mice. *Endocrinology*. v. 152, p. 1492–1502. 2011. doi: 10.1210/en.2010-1273.

Podratz, P. L., Delgado Filho, V. S., Lopes, P. F. I., Sena, G. C., Matsumoto, S. T., Samoto, V. Y., Takiya, C. M., de Castro Miguel, E., Silva, I. V., Graceli, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. v. 75, p. 1035-46. 2012. doi: 10.1080/15287394.2012.697826

Podratz, P. L., Merlo, E., Sena, G.C., Morozesk, M., Bonomo M.M., Matsumoto, S. T., da Costa, M. B., Zamprogno, G.C.; Brandão, P.A.; Carneiro, M. T.; Miguel Ede, C.;

MirandaAlves, L.; Silva, I. V.; Graceli, J. B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. *Reproductive Toxicology*. v. 57, p. 29-42. 2015. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.05.003.

Preston, A. R., and Eichenbaum, H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current Biology*. v.23, p. R764–R773. 2013. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.041.

Prokai, L., Nguyen, V., Szarka, S., Garg, P., Sabnis, G., Bimonte-Nelson, H. A., McLaughlin, K. J., Talboom, J. S., Conrad, C. D., Shughrue, P. J., Gould, T. D., Brodie, A., Merchenthaler, I., Koulen, P., Prokai-Tatrai, K. The prodrug DHED selectively delivers 17 β -estradiol to the brain for treating estrogen-responsive disorders. *Science Translational Medicine*. v. 7(297), p. 297ra113. 2015.

Ramezani, A., Goudarzi, I., Lashkarbolouki, T., Ghorbanian, M.T., Salmani, M.E., Abrari, K. Neuroprotective effects of the 17 β -estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological and behavioral changes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v. 100(1), p. 144-151. 2011. doi: 10.1016/j.pbb.2011.07.010.

Reilly, M.P., Weeks, C.D., Topper, V.Y., Thompson, L.M., Crews D., Gore A.C. The effects of prenatal .PCBs on adult social behavior in rats. *Hormones and Behavior*. v. 73, p. 47-55. 2015. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.002.

Rosenfeld C.S., Shay D.A., Vieira-Potter V.J. Cognitive Effects of Aromatase and Possible Role in Memory Disorders. *Frontiers in Endocrinology*. v. 9. p. 610. 2018. doi:10.3389/fendo.2018.00610

Ruiz, J. M., Bachelet, G., Caumette, P. and Donard, O. F. X. Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environmental Pollution*. v. 94 (1), p. 103. 1996. doi: 10.1016/0269-7491(96)00029-2

Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.289, p.198-204. 2001. doi: 10.1006/bbrc.2001.5952

Sant'Anna, B.S., Santos, D.M., Marchi, M.R.R., Zara, F.J., Turra, A. Surface-sediment and hermit-crab contamination by butyltins in southeastern Atlantic estuaries after ban of TBT-based antifouling paints. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 21, p. 6516–6524. 2014. doi: 10.1007/s11356-014-2521-8

Sena G.C., Freitas-Lima L.C, Merlo E., Podratz P.L., de Araújo J.F.P., Brandão P.A.A., Carneiro M.T.W.D., Zicker M.C., Ferreira A.V.M., Takiya C.M., de Lemos Barbosa C.M., Morales M.M., Santos-Silva A.P., Miranda-Alves L., Silva I.V., Graceli J.B. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 319. p. 22-38. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.021>.

Shanmugan, S., & Epperson, C. N. Estrogen and the Prefrontal Cortex: Towards A New Understanding of Estrogen's Effects on Executive Functions in the Menopause Transition. *Human Brain Mapping*. v. 35(3), p.847–865. 2014. doi: 10.1002/hbm.22218

Sharan, S., Nikhil, K., Roy, P. Effects of low dose treatment of tributyltin on the regulation of estrogen receptor functions in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 269 (2). p. 176-186. 2013. doi: 10.1016/j.taap.2013.03.009.

Shum, C., Macedo, S. C., Warre-Cornish, K., Cocks, G., Price, J., & Srivastava, D. P. Utilizing induced pluripotent stem cells (iPSCs) to understand the actions of estrogens in human neurons. *Hormones and Behavior*. v.74, p. 228–242. 2015. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.014.

Si, J., Li, J., Zhang, F., Li, G., Xin, Q. Dai, B. Effects of perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride on pregnancy outcome and postnatal development in mouse offspring. *Environmental Toxicology*, v. 27, p. 605-612. 2012 doi:10.1002/tox.20753

Siedlecki, K. L., Salthouse, T. A. Using contextual analysis to investigate the nature of spatial memory. *Psychonomic Bulletin & Review*. v. 21(3), p. 721-727. 2014. doi: 10.3758/s13423-013-0523-z

Sobolewski M., Conrad K., Allen J.L., Weston H., Martin K., Lawrence B.P., Cory-Slechta D.A. Sex-specific enhanced behavioral toxicity induced by maternal exposure to a mixture of low dose endocrine-disrupting chemicals. *Neurotoxicology*. 2014. v. 45, p.121-30. doi: 10.1016/j.neuro.2014.09.008.

Spence, R. D., Hamby, M. E., Umeda, E., Itoh, N., Du, S., Wisdom, A. J., Cao, Y., Bondar, G., Lam, J., Ao, Y., Sandoval, F., Suriyani, S., Sofroniew, M. V., Voskuhl, R. R. Neuroprotection mediated through estrogen receptor-alpha in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108(21), p. 8867-8872. 2011. doi: 10.1073/pnas.1103833108

Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M., Penzes, P. Insights into Rapid Modulation of Neuroplasticity by Brain Estrogens. *Pharmacological Reviews*. v. 65(4), p. 1318–1350. 2013. doi: 10.1124/pr.111.005272.

Sutherland, R.J., Rudy, J.W.. Configural association theory: the contribution of the hippocampus to learning, memory, and amnesia. *Psychobiology*. v.17, p. 129–144. 1989. doi: 10.3758/BF03337828

Tang S.S., Ren Y., Xu L.J., Cao J.R., Hong H., Ji H., Hu QH. Activation of ER α and/or ER β ameliorates cognitive impairment and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hormones and Behavior*. v. 105. p. 95-103. 2018. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.08.002.

ten Hallers-Tjabbes, C. C., Kemp, J. F. and Boon, J. P. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: Relation to shipping traffic intensities. *Marine Pollution Bulletin*. v. 28(5), p. 311–313. 1994. doi: 10.1016/0025-326X(94)90156-2

Tian, H., Wu, P., Wang, W., Ru, S.G. Disruptions in aromatase expression in the brain, reproductive behavior, and secondary sexual characteristics in male guppies (*Poecilia reticulata*) induced by tributyltin. *Aquatic Toxicology*. v. 162, p. 117–125. 2015. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.015

Tuscher, J. J., Fortress, A. M., Kim, J., Frick, K. M. Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones. *Behavioural Brain Research*. v. 285, p.140– 157. 2015. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.001.

Tuscher, J.J., Taxier, L.R., Fortress, A. M., Frick, K. M. Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. v. 156, p. 103-116. 2018. doi: 10.1016/j.nlm.2018.11.002.

Varela-Ramirez, A., Costanzo, M., Carrasco, Y. P., Pannell, K. H., Aguilera, R. J. Cytotoxic effects of two organotin compounds and their mode of inflicting cell death on four mammalian cancer cells. *Cell biology and Toxicology*, v. 27(3), p. 159-168. 2010. doi: 10.1007/s10565-010-9178-y

Walf, A. A., Paris, J. J., Rhodes, M. E., Simpkins, J. W., & Frye, C. A. Divergent mechanisms for trophic actions of estrogens in the brain and peripheral tissues. *Brain Research*, v. 1379, p. 119–136. 2011. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.081

Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., Nelson, K.G. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*. v. 131, p.1458–1466. 1992. doi: 10.1210/endo.131.3.1505477

Wang, C., Li, Z., Han, H., Luo, G., Zhou, B., Wang, S., Wang, J. Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippocampus. *Toxicology*. v. 341-343, p. 56-64. 2016. doi: 10.1016/j.tox.2016.01.010.

Warburton, E. C., & Brown, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, v.285, p.131–139. 2015. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.050.

Weiss, B., Laties, V.G. Behavioral Toxicology. New York: Plenum Press. 1975.

Weiss, B. Behavioral toxicology and environmental health science: Opportunity and challenge for psychology. *American Psychologist*. v. 38(11), p. 1174-1187. 1983. doi: 10.1037/0003-066X.38.11.1174

World Health Organization (WHO). IPCS, environmental health criteria 116, tributyltin compounds. WHO Offset Publication. N°. 38. WHO, Geneva. 1990.

Xiao, W.Y., Li, Y.W., Chen, Q.L., Liu, Z.H. Tributyltin impaired reproductive success in female zebrafish through disrupting oogenesis, reproductive behaviors and serotonin synthesis. *Aquatic Toxicology*, v. 200, p. 206-216. 2018. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.05.009.

Yaffe, K., Lui, L.Y., Grady, D., Cauley, J., Kramer, J., Cummings, S.R.. Cognitive decline in women in relation to non-protein-bound oestradiol concentrations. *The Lancet*. v. 356, p.708– 712. 2000. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02628-3

Yeo, M., Berglund, K., Hanna, M., Guo, J.U., Kittur, J., Torres, M.D., Abramowitz, J., Busciglio, J., Gao, Y., Birnbaumer, L., Liedtke, W.B. Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the Kcc2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 110(11), p. 4315-4320. 2013. doi: 10.1073/pnas.1300959110.

Yu, A., Wang, X., Zuo, Z., Cai, J., Wang, C. Tributyltin exposure influences predatory behavior, neurotransmitter content and receptor expression in *Sebastiscus marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, v. 128-129, p. 158-162. 2013. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.00.

Zaccaroni, M., Seta, D.D., Farabollini, F., Fusani, L., Dessì-Fulgheri, F.. Developmental Exposure to Very Low Levels of Ethynilestradiol Affects Anxiety in a Novelty Place Preference Test of Juvenile Rats. *Neurotoxicity Research*. v.30 (4). 2016. doi:10.1007/s12640-016-9645-1.

Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L. Hormone Replacement Therapy and Incidence of Alzheimer Disease in Older Women: The Cache County Study. *JAMA*. v. 288(17), p. 2123–2129. 2002. doi:10.1001/jama.288.17.2123

Zhao, L., Brinton, R. D. Select estrogens within the complex formulation of conjugated equine estrogens (Premarin®) are protective against neurodegenerative insults: implications for a composition of estrogen therapy to promote neuronal function and

prevent Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*. v.7, p. 24. 2006. doi: 10.1186/1471-2202-7-24

Zhang, J., Zhang, C., Sun, P., Shao, X. Tributyltin affects shoaling and anxiety behavior in female rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquatic Toxicology*, v. 178, p. 80-87. 2016a. doi:10.1016/j.aquatox.2016.07.007.

Zhang, J., Sun, P., Yang, F., Kong, T., Zhang, R. Tributyltin disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*. v. 152, p. 221-228. 2016b. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.127.

Zhang, Q. G., Raz, L., Wang, R., Han, D., De Sevilla, L., Yang, F., Vadlamudi, R. K., Brann, D. W. Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *Journal of Neuroscience*, v. 29(44),p. 13823-13836. 2009. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-09.2009.