Os impactos dos plastificantes de preocupação emergente – BPS e BPAF – na espermatogênese, reprodução, qualidade espermática e desenvolvimento do zebrafish (*Danio rerio*).

Daniel Fernandes da Costa

BOTUCATU – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Os impactos dos plastificantes de preocupação emergente – BPS e BPAF – na espermatogênese, reprodução, qualidade espermática e desenvolvimento do zebrafish (*Danio rerio*).

DANIEL FERNANDES DA COSTA

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Costa, Daniel Fernandes da.
Os impactos dos plastificantes de preocupação emergente – BPS e BPAF – na espermatogênese, reprodução, qualidade espermática e desenvolvimento do zebrafish (*Danio rerio*) / Daniel Fernandes da Costa. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Rafael Henrique Nóbrega
Capes: 20204000

1. Plastificantes. 2. Bisfenol A. 3. Contaminantes emergentes na água. 4. Desreguladores endócrinos. 5. Epigenética. 6. Peixe-zebra - Reprodução. 7. Fenóis.

Palavras-chave: BPA; Bisfenóis; Contaminantes; Endócrino; Epigenética.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DANIEL FERNANDES DA COSTA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 28 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 08:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de DANIEL FERNANDES DA COSTA, intitulada **Os impactos dos plastificantes de preocupação emergente – BPS e BPAF – na espermatogênese, reprodução, qualidade espermática e desenvolvimento do zebrafish (*Danio rerio*)**. A Comissão Examinadora foi constituida pelos seguintes membros: Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, Profa. Dra. FABIANA LAURA LO NOSTRO (Participação Virtual) do(a) Departamento da Biodiversidade e Biologia Experimental Aplicada / Faculdade de Ciências Exatas e Naturais - Universidad de Buenos Aires, Argentina, Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fisiologia / Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo - SP, Pós-doutorando ARNO JULIANO BUTZGE (Participação Virtual) do(a) Laboratório de Genética / Centro de Aquicultura da UNESP - Jaboticabal, Prof. Dr. LÁZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final:_ _ _ APROVADO _ _ _ . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

Documento assinado digitalmente
gov.br
RAFAEL HENRIQUE NOBREGA
Data: 28/08/2024 12:21:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Maria Fernandes da Costa e Mirian Aparecida da Silva Fernandes da Costa (*in memoriam*) e aos irmãos Mateus, Sara, Alexandre e Júlio, pelo apoio e suporte essenciais que sempre me proporcionaram;

Aos amigos Victor Ribeiro e Jorge Ribeiro;

A todos os peixes utilizados nesta pesquisa;

Aos escritores que me fortaleceram metafisicamente ao longo desta desafiadora caminha: Dostoiévski, Fernando Pessoa, Sartre, Tolstói, Schopenhauer, Hermann Hess, Goethe, Gógol, Marx, Engels, entre outros;

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho¨ (UNESP), ao instituto de Biociências, ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Câmpus de Botucatu, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), pela valiosa oportunidade de cursar o doutorado nesta Instituição;

A realização da presente tese só foi possível graças às indispensáveis contribuições de:

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, expresso minha gratidão por me integrar ao seu grupo de pesquisa (Reproductive and Molecular Biology Group), pela orientação e dedicação ao presente projeto, além da confiança e dos conhecimentos compartilhados desde os tempos de mestrado;

Ao Prof Dr. Hamid R. Habibi, agradeço o acolhimento em terras estrangerias, pelas orientações e todo o suporte fornecido por seu laboratório na Universidade de Calgary;

À Universidade de Calgary (Alberta, Canadá) e ao Departamento de Ciências Biológicas da mesma Instituição

Aos pesquisadores e amigos do laboratório Reproductive and Molecular Biology Group, em especial ao Dr. Lucas Doretto, à Msc. Maira Rodrigues, à Msc. Ivana Felipe, ao Dr. Aldo Tovo-Neto, à Dr.ª Juliana Ricci, ao Dr. Marcos Oliveira, ao Dr. Arno Butzge, à Beatriz Marques, à Luciana Borali e à Camila Silva, agradeço o companheirismo e pelos ensinamentos práticos e teóricos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico; bem como para a produção desta tese;

Aos Professores Dr.ª Percília Giaquinto (Unesp, Botucatu) e Dr. Eduardo Sanches (Unesp, Registro), pela colaboração neste projeto;

Ao Msc. Bruno Camargo, pela ajuda na condução de experimentos;

À aluna de Iniciação científica Luciana Borali, pela dedicação e auxílio no laboratório;

Aos pesquisadores e amigos do laboratório do Prof Dr. Hamid R. Habibi, MSc. Maya Zanardini e Jesse Neumann, pela recepção atenciosa e apoio nos experimentos;

À Dr.ª Adriana Carvalho, pelos comentários valiosos durante a elaboração da tese;

Aos servidores do Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e a bolsa no exterior concedida pelo Edital 44/2022 – Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG).

Recebam meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

O Bisfenol A (BPA) é um plastificante amplamente utilizado que tem sido extensivamente estudado devido à sua ação adversa no eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG). Bisfenóis alternativos, como o bisfenol-S (BPS) e o bisfenol-AF (BPAF), foram desenvolvidos para substituir o BPA. Estudos recentes demonstraram que estes compostos também podem atuar como desreguladores endócrinos. Dito isso, o objetivo desta tese foi estudar os efeitos do BPS e BPAF na reprodução dos machos de zebrafish (*Danio rerio*) após exposição de explantes testiculares (*ex vivo*) e *in vivo*. Para tanto, machos adultos de zebrafish foram expostos aos análogos do BPA, o BPS e o BPAF por 14 dias, em concentrações ambientalmente relevantes distintas. Além disso, também realizamos exposição *ex vivo* utilizando explantes testiculares tratados com concentrações crescentes de BPS e BPAF por 7 dias. Em seguida, avaliamos a espermatogênese *ex vivo* e *in vivo* por meio de análise histomorfométrica das células germinativas e de expressão gênica, quantificando uma série de genes envolvidos na função gonadal. Posteriormente, *in vivo*, ainda avaliamos os efeitos na produção do hormônio androgênico 11-KT e na qualidade espermática. Além disso, realizamos reprodução dos machos expostos com fêmeas não tratadas, e avaliamos possíveis efeitos intergeracionais nos embriões/larvas, analisando a eclosão, o desenvolvimento, a sobrevivência e a expressão gênica da prole (F1). Por fim, os mesmos parâmetros foram investigados em embriões/larvas diretamente expostos ao BPS ou BPAF. Nossos resultados mostraram pela primeira vez em peixes um efeito androgênico do BPS na produção hormonal, elevando a concentração plasmática do 11-KT. Em relação aos testículos, encontramos desregulação da função testicular, em geral, os tratamentos *ex vivo* e *in vivo* com BPS e BPAF alteraram a expressão gênica de enzimas esteroidogênicas (*cyp19a1a*, *star* e *cyp7a1*) e enzimas de regulação epigenética. Em relação aos dados histomorfométricos, a exposição *ex vivo* ao BPS e ao BPAF reduziu a frequência de cistos de espermatócitos primários em paquíteno. *in vivo*, aumentou os cistos meióticos (espermatócitos) e pós-meióticos (espermátides), indicando estímulo para o término da meiose. No grupo BPS, este estímulo levou a uma produção anormal de espermatozoides. No entanto, o efeito androgênico do BPS não se refletiu na qualidade do esperma e na viabilidade dos embriões, que foram impactadas negativamente. Também observamos ações adversas dos contaminantes na qualidade espermática, reduzindo a motilidade. Na geração F1, houve um atraso acentuado nas taxas de eclosão, aumento de malformações e mortalidade. Embriões/larvas diretamente expostos ao BPS ou BPAF não exibiram alterações no desenvolvimento, porém apresentaram estímulo de expressão de genes relacionados ao estrógeno (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1*). Ao todo, nossos dados indicam que o BPS e o BPAF podem ter efeitos epigenéticos e afetar a reprodução, desregulando a esteroidogênese e a espermatogênese. O presente trabalho encontrou evidências de efeito intergeracional dos contaminantes na informação paterna. Este estudo fornece suporte à hipótese de que o BPS e o BPAF exercem efeitos epigenéticos e impactam negativamente a reprodução, alterando a esteroidogênese e a espermatogênese. No geral, fornecemos maiores informações sobre as consequências dos bisfenóis alternativos, BPS e BPAF, na fisiologia e reprodução dos peixes.

PALAVRAS-CHAVE:

bisfenóis, BPA, endócrino, contaminantes, epigenética

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a widely used plasticizer that has been extensively studied due to its adverse action on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Alternative bisphenols, such as bisphenol-S (BPS) and bisphenol-AF (BPAF), have been developed to replace BPA. Recent studies have shown that these compounds can also act as endocrine disruptors. That said, the objective of this thesis was to study the effects of BPS and BPAF on the reproduction of male zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to testicular explants (*ex vivo*) and *in vivo*. To this end, adult male zebrafish were exposed to BPA analogues, BPS and BPAF for 14 days, at different environmentally relevant concentrations. Furthermore, we also performed *ex vivo* exposure using testicular explants treated with increasing concentrations of BPS and BPAF for 7 days. We then evaluated *ex vivo* and *in vivo* spermatogenesis through histomorphometric analysis of germ cells and gene expression, quantifying a series of genes involved in gonadal function. Subsequently, *in vivo*, we also evaluated the effects on the production of the androgenic hormone 11-KT and on sperm quality. Furthermore, we reproduced exposed males with untreated females, and evaluated possible intergenerational effects on embryos/larvae, analyzing hatching, development, survival and gene expression of the offspring (F1). Finally, the same parameters were investigated in embryos/larvae directly exposed to BPS or BPAF. Our results showed for the first time in fish an androgenic effect of BPS on hormone production, increasing the plasma concentration of 11-KT. In relation to the testis, we found dysregulation of testicular function, in general, *ex vivo* and *in vivo* treatments with BPS and BPAF altered the gene expression of steroidogenic enzymes (*cyp19a1a*, *star* and *cyp7a1*) and epigenetic regulatory enzymes. Regarding histomorphometric data, *ex vivo* exposure to BPS and BPAF reduced the frequency of primary spermatocyte cysts in pachytene. *in vivo*, it increased meiotic (spermatocytes) and post-meiotic (spermatids) cysts, indicating a stimulus for the completion of meiosis. In the BPS group, this stimulus led to abnormal sperm production. However, androgenic effect of BPS was not reflected in sperm quality and embryo viability, which were negatively impacted. We also observed adverse effects of contaminants on sperm quality, reducing motility. In the F1 generation, there was a marked delay in hatching rates, an increase in malformations and mortality. Embryos/larvae directly exposed to BPS or BPAF did not exhibit changes in development, but showed stimulation of expression of estrogen-related genes (*esr1*, *cyp19a1b* and *vgt1*). Altogether, our data indicate that BPS and BPAF may have epigenetic effects and affect reproduction by dysregulating steroidogenesis and spermatogenesis. The present work found evidence of an intergenerational effect of contaminants on paternal information. This study provides support for the hypothesis that BPS and BPAF exert epigenetic effects and negatively impact reproduction by altering steroidogenesis and spermatogenesis. Overall, we provide further information on the consequences of alternative bisphenols, BPS and BPAF, on fish physiology and reproduction.

KEYWORDS bisphenols, BPA, endocrine, contaminants, epigenetics

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....10

1.1 Contaminantes ambientais de preocupação emergente.....11

1.2 Desreguladores endócrinos.....12

1.3 O processo espermatogênico.....13

1.4 O eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) e mecanismos regulatórios da espermatogênese.....17

1.5 Bisfenol A (BPA).....21

1.6 O BPA e seus efeitos como desregulador endócrino e na reprodução masculina.....23

1.7 O desenvolvimento de substitutos ao BPA.....24

1.8 Bisfenol S (BPS).....26

1.9 O BPS e seus efeitos como desregulador endócrino e na reprodução masculina.....28

1.10 Bisfenol AF (BPAF).....29

1.11 O BPAF e seus efeitos como desregulador endócrino na reprodução masculina.....31

Zebrafish (*D. rerio*) como modelo experimental.....33

Justificativa.....33

Objetivo Geral.....34

Objetivos específicos.....34

Referências.....36

CAPÍTULO 1 - Efeitos dos bisfenóis alternativos (BPS e BPAF) na espermatogênese do zebrafish (*Danio rerio*) *ex vivo*: danos à meiose e desregulação transcricional de genes relacionados ao processo espermatogênico e à regulação epigenética.....46

Introdução.....48

Material e métodos.....50

Resultados.....53

Discussão.....61

Conclusão.....68

Referências.....69

CAPÍTULO 2 - Bisfenol-S (BPS) tem efeito androgênico, estimula a espermatogênese e afeta o desenvolvimento e a sobrevivência dos embriões de modo intergeracional em zebrafish (*Danio rerio*).....75

Introdução.....77

Material e métodos.....79

Resultados.....86

Discussão.....94

Conclusão.....100

Referências.....101

CAPÍTULO 3 - Bisfenol-AF (BPAF) desregula a espermatogênese, reduz a qualidade espermática, e afeta a eclosão e a sobrevivência dos embriões de modo intergeracional em zebrafish (*Danio rerio*).....109

Introdução.....111

Material e métodos.....112

Resultados.....120

Discussão.....128

Conclusão.....134

Referências.....136

CONCLUSÃO GERAL.....144

APÊNDICE.....146

Introdução geral

¨Enquanto eras anteriores da história humana podem ser amplamente definidas por um único metal ou liga (ou seja, Idade do Ferro ou Idade do Bronze), as composições materiais das tecnologias emergentes de hoje abrangem quase toda a tabela periódica e estão em constante evolução¨ (Gulley *et al*., 2018)

1.1 Contaminantes ambientais de preocupação emergente

Durante a primeira revolução industrial, ocorreu uma extensa poluição, que resultou em um aumento significativo na contaminação de ambientes aquáticos por metais (Candelone *et al*., 1995). Após a Segunda Guerra Mundial, houve uma disseminação global da contaminação por compostos químicos sintéticos (Colborn *et al*., 1993), tais como desreguladores endócrinos, pesticidas e solventes orgânicos (Ma *et al*., 2019; Lo Nostro *et al*., 2023). Durante a Guerra fria, surge o primeiro provável relato a respeito da consciência da ¨emergência¨ dos contaminantes ambientais emergentes, atribuído a Rachel Carson em seu livro "Silent Spring" de 1962 (Carson, 1962). Onde foi demonstrado de forma convincente que o uso generalizado do diclorodifeniltricloroetano (DDT) para eliminar mosquitos e outras pragas levou à morte e ao desaparecimento de diversas aves (Sauvé & Desrosiers, 2014). Apesar das críticas recebidas pela autora por parte de empresas químicas (Paull, 2013), anos de pesquisa a frente confirmaram suas alegações e levaram ao banimento do pesticida. O impacto do livro nos governos, na indústria e na sociedade civil foi imediato e substancial, sendo considerado um marco ao destacar a mensagem reveladora de que produtos químicos podem ser problemáticos e prejudiciais ao meio ambiente (Paull, 2013, Sauvé & Desrosiers, 2014).

Desde então, contaminantes ambientais de preocupação emergente, os "contaminantes emergentes" (ECs), incluem um conjunto diversificado de milhares de substâncias químicas que até agora estavam em grande parte fora do âmbito de monitoramento e regulamentação (Yan *et al*., 2010). Sauve & Desrosiers (2014) definiram produtos químicos como contaminantes de "interesse ou preocupação" emergente/recente (contaminantes emergentes) se tiverem sido medidos - ou suspeitos de estarem presentes - em vários compartimentos do meio ambiente, e sua toxicidade alterar o metabolismo dos organismos (Lo Nostro *et al*., 2023) Esta categoria de contaminantes que tem sido amplamente distribuída no ambiente e tem atraído a atenção de um grupo amplo de pessoas como cidadãos, cientistas e engenheiros, agências estaduais e federais, grupos ambientalistas, grupos industriais e de mercadorias, reguladores e outros. Esses contaminantes são predominantemente produtos químicos antropogênicos não regulamentados que ocorrem no ar, solo, água, alimentos e tecidos humanos/animais, sendo persistentes no ambiente e capazes de perturbar a fisiologia dos organismos e seus receptores alvos (Yan *et al*., 2010).

As classes proeminentes de contaminantes de preocupação emergente incluem produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, surfactantes e seus produtos de degradação,

plastificantes, retardadores de chama, pesticidas e nanomateriais (Yan *et al*., 2010; Salimi *et al*., 2017). Além disso, as estações de tratamento de esgoto não foram projetadas para remover especificamente contaminantes de preocupação emergente, o que permite que essas substâncias passem pelo sistema de tratamento sem serem efetivamente eliminadas pelos mecanismos de remoção (Farto *et al*., 2021). Além disso, diversos estudos relatam a bioacumulação destes compostos em macro invertebrados, assim como em outros organismos na cadeia alimentar aquática e no homem (Rochester & Bolden, 2015; Wang *et al*., 2017; Previsic *et al.*, 2020; Pan *et al*., 2020; Farto *et al*., 2021). No Brasil, a ocorrência de diversos contaminantes de preocupação emergente em águas deste território é uma realidade, como exemplo, já foram detectados plastificantes, fármacos, hormônios dentre outras classes de compostos químicos (Lima *et al*., 2017; Lima *et al*., 2018; Farto *et al*., 2021).

1.2 Desreguladores endócrinos

Alguns dos contaminantes de preocupação emergente são reconhecidos como desreguladores endócrinos (EDCs) (Yan *et al*., 2010). É bem reconhecido que os EDCs representam um risco potencial para a vida selvagem e a saúde humana em escala global (Kumar *et al*., 2020). Desreguladores endócrinos estão presentes em nosso meio ambiente, alimentos e produtos voltados ao consumo, e podem perturbar o equilíbrio hormonal e resultar em efeitos adversos à saúde (Vethaak & Legler, 2013). O conceito de EDC foi proposto em 1991 durante uma conferência em Wingspread (Wisconsin, USA), onde um grupo de cientistas reuniu diversos efeitos prejudiciais associados ao uso intensivo de pesticidas na agricultura, tanto sobre a vida selvagem quanto em seres humanos (Vandenberg *et al*., 2009; Fenichel *et al*., 2013). Na conferência, foi acordado adotar o termo "disruptor endócrino" para descrever uma classe de substâncias químicas, incluindo aquelas que atuam nos receptores de estrogênio, receptor de andrógeno, receptor de hormônio tireoidiano e outros. Desde então, essa definição evoluiu e o campo se expandiu incluindo centenas de outros produtos químicos (Vandenberg *et al*., 2009)

A definição exata de disruptor endócrina vária com a organização (Lee *et al* 2021). Por exemplo, a agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos, USEPA, define o termo como ¨agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos¨. A Sociedade de Endocrinologia define

como ¨ um químico exógeno, ou uma mistura de produtos químicos, que podem interferir com qualquer aspecto da ação de um hormônio¨. Uma definição mais completa, pode ser encontrada em Lo Nostro e colaboradores, 2023, aqui transcrita *¨Um contaminante pode ser classificado como um produto químico EDC se atuar em nível celular ou molecular, interagindo com a ativação ou antagonização de receptores hormonais, alterando a expressão de receptores hormonais, alterando a transdução de sinal em células responsivas a hormônios, induzindo modificações epigenéticas em células produtoras de hormônios ou responsivas a hormônios, ou modificando a síntese, distribuição, níveis circulantes, transporte através de membranas ou metabolismo de hormônios¨*. Centenas de produtos químicos naturais ou produzidos pelo homem atendem a esses critérios e são conhecidos ou suspeitos de interferir na regulação fisiológica e endocrinológica da reprodução (Lo Nostro *et al*., 2023) sendo relatados efeitos no sistema endócrino de mamíferos, aves, répteis, peixes, anfíbios e invertebrados (Vethaak & Legler, 2013). Portanto, os produtos químicos que podem atuar como EDCs são especialmente preocupantes à saúde, uma vez que podem alterar as vias endócrinas, incluindo aquelas que controlam a reprodução (Delbes *et al*., 2022; Lo Nostro *et al*., 2023). Dentre os vários tipos de EDCs, os bisfenóis estão entre os contaminantes mais utilizados, sendo o foco desta tese.

1.3 O processo espermatogênico

A espermatogênese é um processo altamente conservado, organizado e complexo, no qual células indiferenciadas - as espermatogônias tronco - são responsáveis por transmitir o material genético de um indivíduo para a próxima geração, após sucessivos ciclos de mitose e meiose (Hess & Franca, 2008; Schulz *et al*., 2010). As espermatogônias tronco são, portanto, as únicas células tronco do organismo capazes de contribuir na formação do material genético da prole, ao se diferenciar em milhares de espermatozoides.

O processo espermatogênico é dividido em três grandes fases: a fase espermatogonial, proliferativa ou mitótica, caracterizada por rounds sucessivos de duplicação mitótica das espermatogônias (ou seja, espermatogônias indiferenciadas incluindo as células tronco, e espermatogônias diferenciadas); fase espermática ou meiótica, na qual os espermatócitos realizam as duas divisões meióticas originando as células espermátides haplóides; e a terceira fase, espermiogênica, onde as espermátides emergindo da meiose se diferenciam em espermatozoides flagelados (Nóbrega *et al*., 2009; Schulz *et al*., 2010; Nóbrega & Lareyre, 2024) (Figura 1).

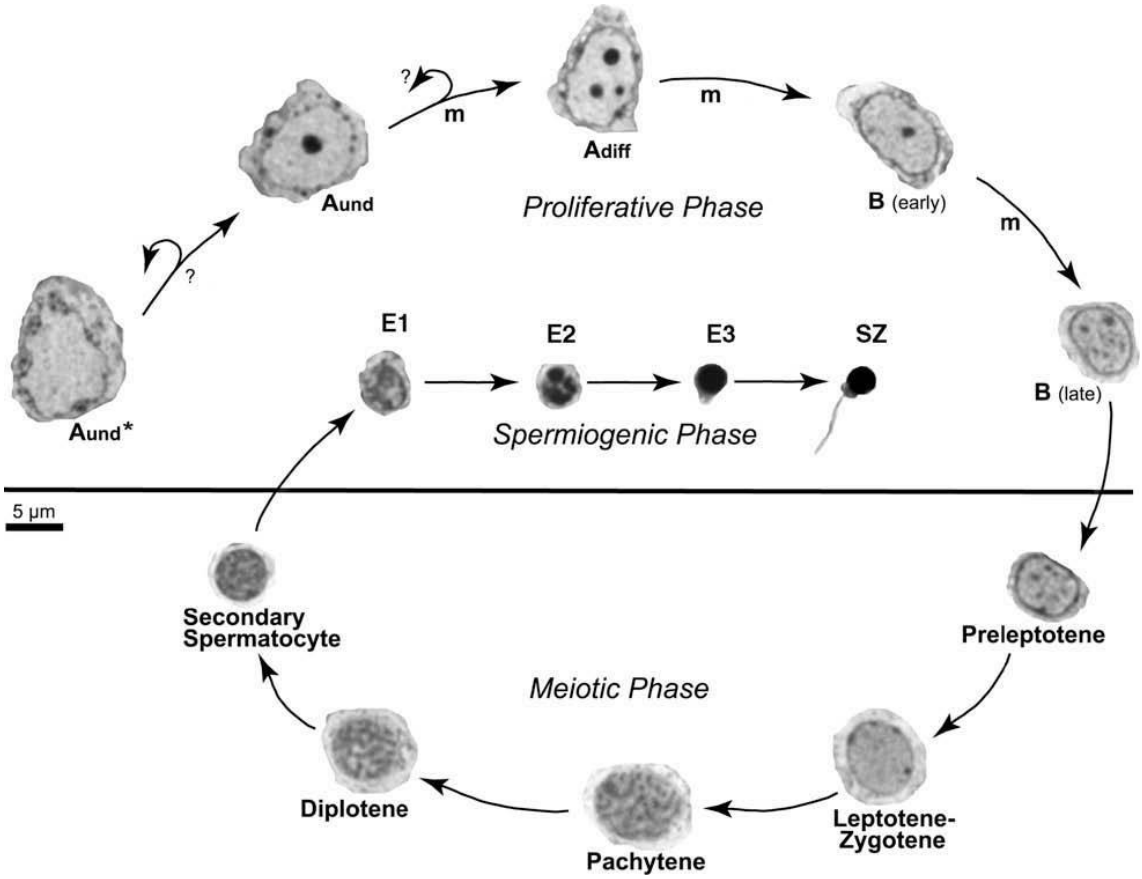


Figura 1. Representação da espermatogênese do zebrafish, partindo das espermatogônias indiferenciadas do tipo A até espermatozóides, ao longo das três fases do processo espermatogênico: espermatogonial, proliferativa ou mitótica; meiótico ou espermática e espermiogênica. As micrografias mostram as principais características de cada tipo celular, embora haja uma variação em sua morfologia e tamanho. Espermatogônias indiferenciadas* tipo A (A_{und}*) (células-tronco?); espermatogônias indiferenciadas tipo A (A_{und}); espermatogônias diferenciadas tipo A (A_{diff}); espermatogônias tipo B (B); auto-renovação (setas curvas); mitose (m); espermátides iniciais (E1); espermátides intermediárias (E2); espermátides finais (E3); e espermatozóides (SZ). A_{und*} e A_{und} são células isoladas, enquanto A_{diff}, B (inicial) e B (tardio) são agrupados. O primeiro ponto de interrogação (?) indica uma dúvida se A_{und*} e A_{und} são separados por uma mitose ou representam diferentes estágios do mesmo ciclo celular, enquanto o segundo ponto de interrogação indica incerteza em relação a "stemness" de A_{und} (Retirado de Schulz *et al*., 2010).

As espermatogônias tronco residem em um microambiente específico no testículo denominado de nicho espermatogonial (Oatley & Brinster, 2008; De Rooij, 2009). Tanto em peixes como em mamíferos, o nicho é composto por dois tipos celulares, as células da linhagem germinativa e as células somáticas. A linhagem germinativa é formada pelas espermatogônias tronco e as células originadas a partir delas. As células somáticas que constituem o nicho são: as células de Sertoli, as peritubulares mióides, células de Leydig e as células endoteliais (Nóbrega *et al*., 2010). As células somáticas dão suporte estrutural e criam um cenário

molecular propício para a sobrevivência, manutenção e atividade das espermatogônias tronco. As células de Sertoli estão localizadas no interior do compartimento germinativo em íntimo contato com as espermatogônias tronco. Em amniotas (répteis e mamíferos), as espermatogônias tronco estão localizadas no compartimento basal, apoiadas sobre uma membrana basal, e circundadas adjacentemente por células de Sertoli (Figura 2A) (McLean 2005; De Rooij, 2006). Já em anamniotas (peixes e anfíbios), as células de Sertoli circundam completamente uma espermatogônias tronco, formando uma estrutura, conhecida como espermatocisto ou cisto (Figura 2B) (Schulz *et al*., 2010; Nóbrega & Lareyre, 2024). Nestes vertebrados, as espermatogônias tronco não estão apoiadas sobre a membrana basal (Nóbrega *et al*., 2010).

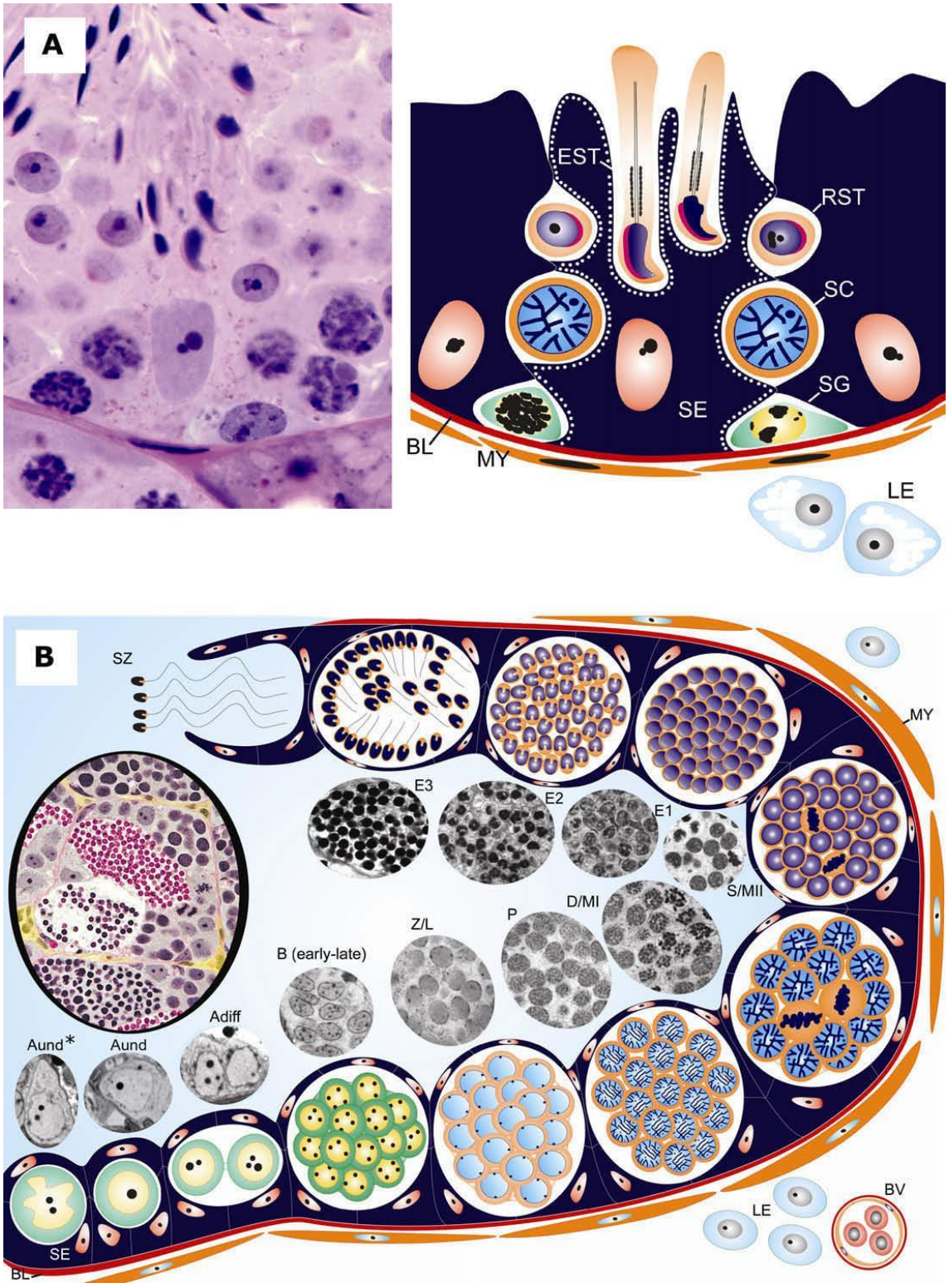


Figura 2. Comparação entre a espermatogênese em estádios de amniotas (répteis, aves, mamíferos) (A) e espermatogênese cística dos anamniotas (peixes, anfíbios) (B). A Figura ilustra as diferenças entre a relação célula de Sertoli/célula germinativa na espermatogênese em estádios e cística. Em A, uma única célula de Sertoli suporta ao mesmo tempo diferentes "clones" de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento. Enquanto em B, a célula de Sertoli suporta apenas um "clone" em uma mesma fase de desenvolvimento por vez. Células de Sertoli (SE); lâmina basal (BL); células peritubulares mióides (MY), células de Leydig (LE), espematogônia (SG);

espermatócito (SC); espermátide arredondada (RST); espermátide alongada (EST); espermatogônia do tipo A indiferenciada* (A_{und}*) (célula tronco?); espermatogônia do tipo A indiferenciada (A_{und}); espermatogônia do tipo A diferenciada (Adiff); espermatogônia do tipo B (B early-late); espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno/metáfase I (D/MI); espermatócitos secundários/metáfase II (S/MII); espermátides iniciais (E1); intermediárias (E2); finais (E3); espermatozóides (SZ); e vasos sangüíneo (BV) (Retirado de Schulz *et al*., 2010).

Além do suporte estrutural, as células de Sertoli também são responsáveis por integrar sinais endócrinos, traduzindo-os em fatores de crescimento e fornecendo suporte estrutural e nutricional para as células germinativas (Lacerda *et al*., 2012; Nóbrega & Lareyre, 2024). As células peritubulares mióides envolvem os túbulos seminíferos e providenciam suporte estrutural a estes. Estas células também secretam fatores de crescimento e componentes de matriz extracelular, indicando importante papel destas células na regulação das espermatogônias tronco (Skinner *et al*., 1985; Maekawa *et al*., 1996; Chen *et al*., 2016a). As células de Leydig, encontradas no compartimento intersticial, tem como função produzir esteróides sexuais (andrógenos) e fatores de crescimento (Chen *et al*., 2017). As células endoteliais produzem fatores de crescimento (regulação angiócrina) e fornecem o aporte nutricional, tensão de oxigênio e endócrino.

1.4 O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HPG) e mecanismos regulatórios da espermatogênese

O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HPG) é um regulador crucial das funções reprodutivas, e compartilha os mesmos componentes reguladores principais em todos os vertebrados (Lo Nostro *et al*., 2023). O eixo é formado por um centro regulador cerebral, o hipotálamo, que produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), atuante na glândula pituitária ou hipófise (Thompson & Kaiser, 2014; Rohrbasser *et al*., 2016). Na pituitária, o GnRH regula a liberação das gonadotropinas Fsh e Lh, que, por sua vez, controlam o desenvolvimento gonadal, gametogênese e esteroidogênese (Borella *et al*., 2020) (Figura 3).

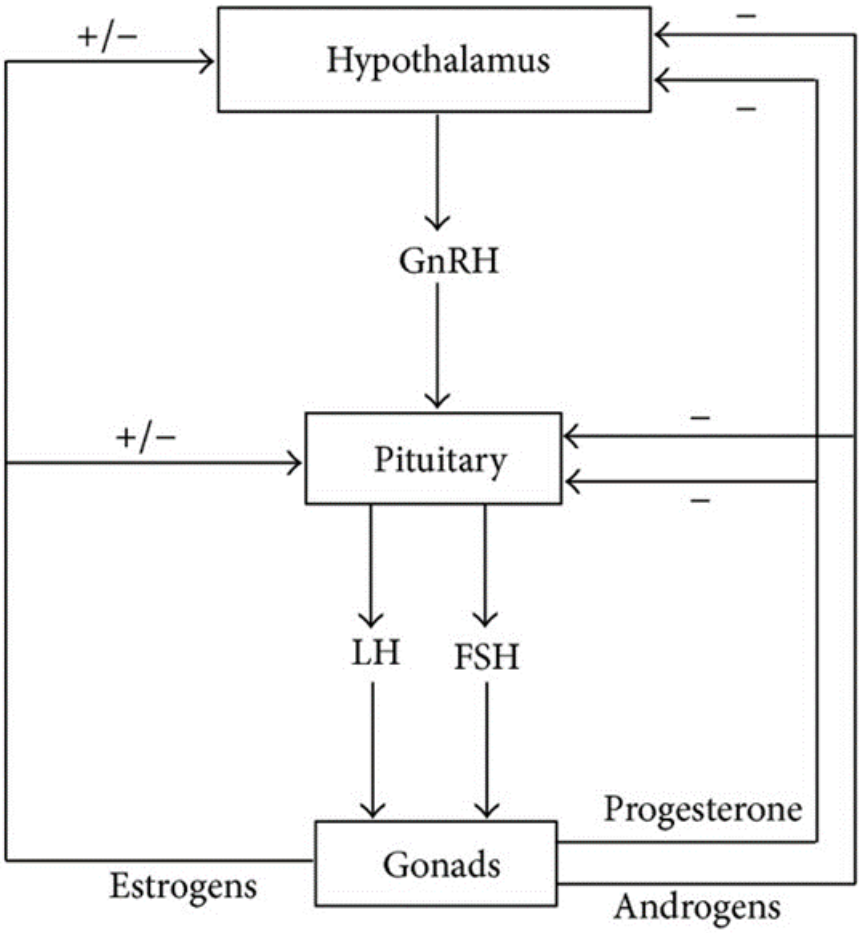


Figura 3. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófisário-gonadal (HPG) mostrando seus principais elementos, assim como sua regulação (Retirado de Cottone *et al*., 2013).

A espermatogênese em vertebrados é regulada principalmente por gonadotropinas e esteroides sexuais que são os principais hormônios reprodutivos. Em mamíferos, o FSH atua exclusivamente em seus receptores presentes nas células de Sertoli (Heckert & Griswold, 1991 e 1993), estimulando a auto-renovação das espermatogônias tronco através do GDNF (*glial-derived neutrophic factor*), uma proteína pertencente a superfamília TGF-β (*transforming growth factor*) produzida pelas células de Sertoli (Yomogida *et al*., 2003; Savitt *et al*., 2012; Doretto *et al*., 2022). Enquanto o LH, através do seu receptor, regula a produção de andrógenos nas células de Leydig (Heckert & Griswold, 1991 e 1993).

Em teleósteos, tanto as células de Sertoli quanto as células de Leydig apresentam receptores para o Fsh (Ohta *et al*., 2007; Chauvigne *et al*., 2012; Nóbrega *et al*., 2015). O receptor de Fsh (Fshr) em peixes também pode ser estimulado pelo Lh (promiscuidade do receptor), entretanto requer altas concentrações de Lh que ocorrem em situações fisiológicas

específicas como nas épocas de desova (final do ciclo reprodutivo) (Schulz *et al*., 2010). Teoricamente, o receptor de Lh (Lhr) também pode ser ativado pelo Fsh, mas em concentrações acima dos níveis fisiológicos, podendo ser considerados Lh específico (Andersson *et al*., 2007; Schulz *et al*., 2010). O Fshr presente nas células de Leydig torna o Fsh um estimulante da androgênese, em particular da produção do 11 Keto-testosterona (11-KT) (Ohta *et al*., 2007; García-López *et al*., 2009; Schulz *et al*., 2010).

A síntese das diferentes classes de esteroides gonadais ocorre a partir do colesterol, que é transportado para a membrana interna da mitocôndria pela enzima Star (proteína esteroidogênica regulatória aguda). A conversão subsequente do colesterol depende principalmente de três enzimas da superfamília do citocromo P450. A primeira dessas enzimas esteroidogênicas P450, o citocromo P450scc (Cyp11a1), realiza a clivagem da cadeia lateral do colesterol, dando origem à pregnenolona. A produção de pregnenolona pelo P450scc é limitada pela taxa de colesterol disponível (Young *et al*., 2005). A partir da pregnenolona, se inicia todo o processo esteroidogênico, onde diversas cascatas de enzimas resultam na síntese de esteróides ativos, como a testosterona, 11-KT, 17-β estradiol (E2) e os corticóides. (Rajakumar *et al*., 2020) (Figura 4).

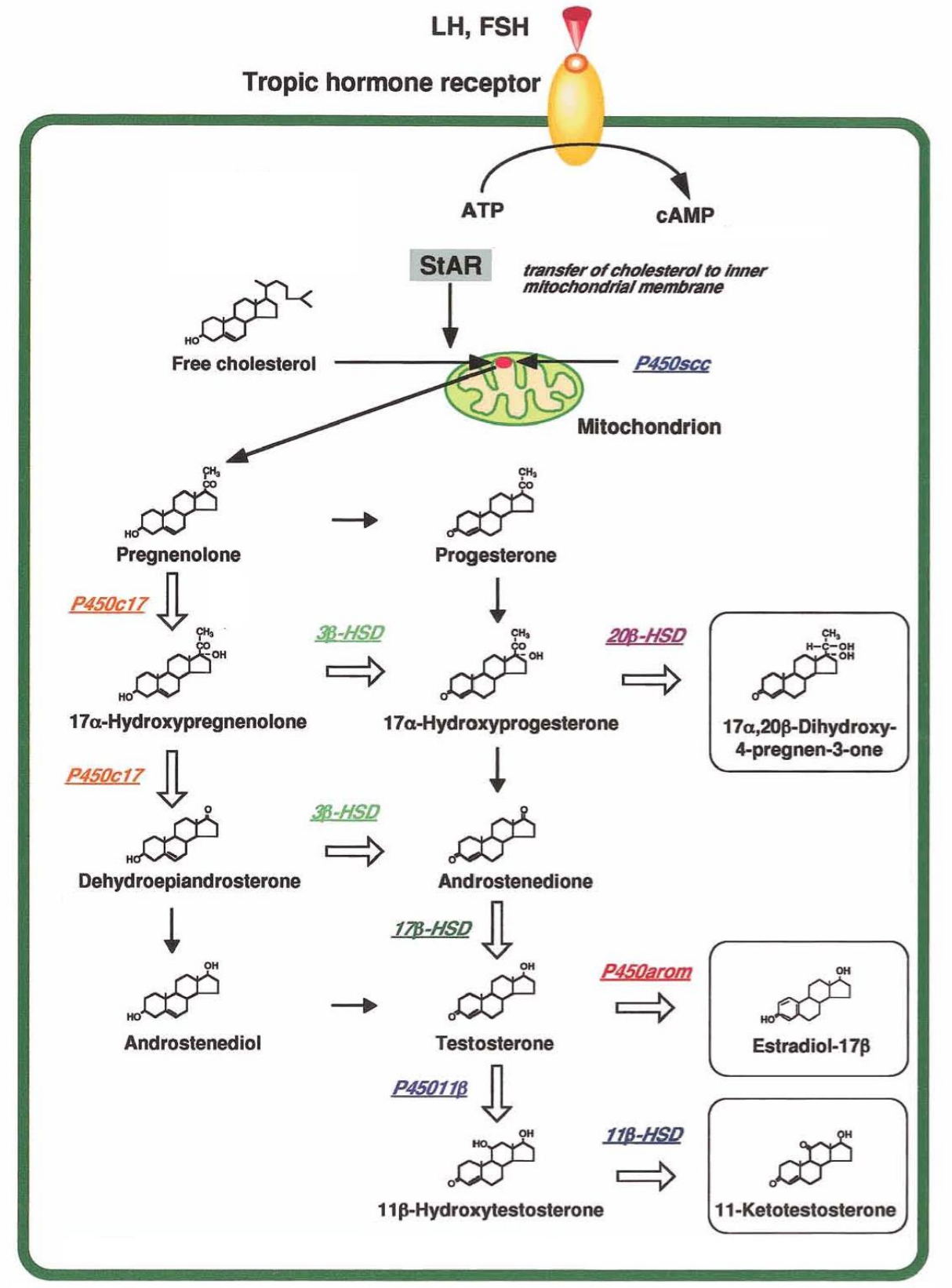


Figura 4. Biossíntese dos hormônios esteroides nas gônadas de peixes teleósteos (Adaptado de Young *et al*., 2005).

Nos teleósteos, os principais andrógenos circulantes são 11-KT e a testosterona (T), e seus níveis têm correlação com o tamanho dos testículos (Weltzien *et al*., 2002; Lo Nostro *et*

al., 2023). O 11-KT é um dos principais hormônios androgênicos em peixes teleósteos e indutor da espermatogênese (Miura *et al*., 1991; Cavaco *et al*., 1998; Miura & Miura, 2003; De Waal *et al*., 2008; Zheng *et al*., 2020). O 11-KT promove a diferenciação dos estágios finais do processo espermatogênico, estimulando os cistos meióticos e pós-meióticos (Cavaco *et al*., 1998; Miura & Miura, 2003; Leal et al 2009). O 11-KT é produzido a partir da testosterona, por ação da enzima 11β-HSD (11β-hidroxiesteroide desidrogenase). A testosterona também pode ser convertida em E2 via Cyp19a1 (Aromatase) (Park *et al*., 2022) (Figura 5). O E2 também é atuante na espermatogênese, favorecendo a proliferação das espermatogônias ao promover a produção de fatores de crescimento pelas células de Sertoli (Yaron & Levavi-Sivan, 2011). Além disso, o E2 reprime os cistos mais diferenciados, por induzir insuficiência de andrógenos (Assis *et al*., 2018; De Waal., 2009). Desta forma, qualquer desequilíbrio nos níveis de esteroides gonadais pode afetar a performance reprodutiva (Park *et al* 2022) e o processo espermatogênico.

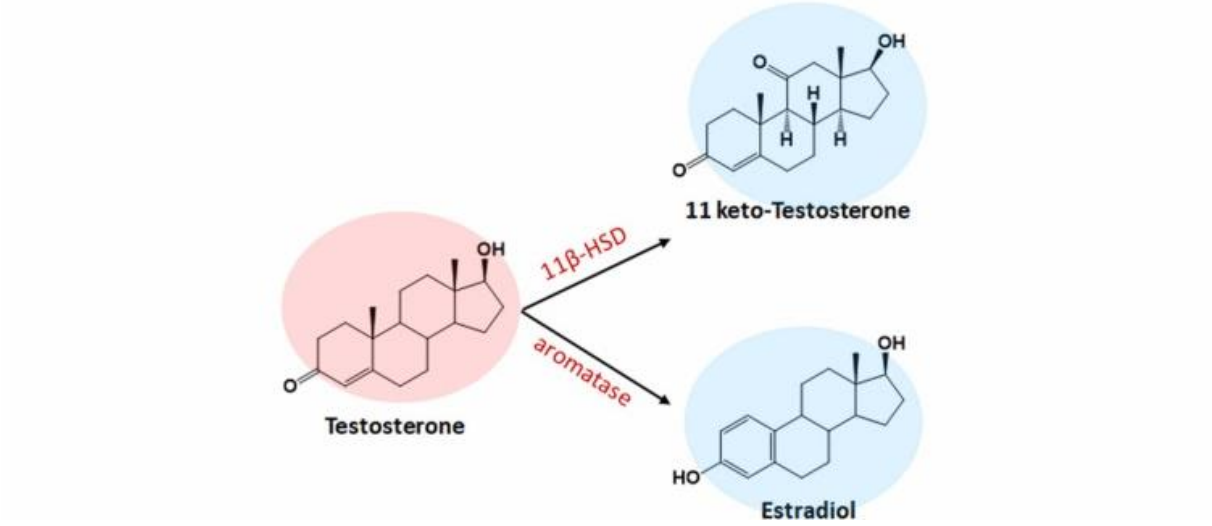


Figura 5. Conversão da testosterona em 11-Ketotostosterona (11-KT) pela enzima 11β-hidroxiesteróide desidrogenase (11β-HSD) ou estradiol via enzima Cyp19a1 (Aromatase) (Adaptado de Park *et al*., 2022).

1.5 Bisfenol A (BPA)

Em 1891, Alexander Pavlovich Dianin, um químico russo, foi o primeiro a descrever o potencial artificial do polímero BPA (Ji *et al*., 2021; Nawaz *et al*., 2021; Kawa *et al*., 2021). A partir de então, desde 1950, o bisfenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane; BPA) vem sendo utilizado como componente chave na produção de plásticos policarbonatos (Forner-Piquer *et al*., 2019). O BPA teve produção massiva a partir de 1960, e sua fabricação segue crescente (Arancio *et al*., 2019). O polímero do BPA é leve, transparente, resistente ao calor e quase

indestrutível, sendo considerado um dos compostos químicos com maior versatilidade utilizados mundialmente na industrial química (Nawaz *et al*., 2021). Atualmente, está na lista de poluentes relacionados à desregulação endócrina (Nawaz *et al*., 2021), e pode ser encontrado em mamadeiras, recipientes de armazenamento de alimentos, garrafas plásticas, equipamentos de laboratório, artigos esportivos, papel térmico (papel recibo), eletrodomésticos entre outros (Departamento de Saúde e Serviços Humanos, 2005; Rubin, 2011; Shi *et al*., 2017). No entanto, de forma preocupante, a liberação do BPA dos plásticos que compõem é conhecida desde o início dos anos 90 (Crain *et al*., 2007). Diversas pesquisas também demonstraram que o BPA já foi detectado em diferentes matrizes ambientais, como água, sedimentos, solo, biomassa e ar (Careghini *et al*., 2015; Xing *et al*., 2022).

Como consequência desta superexposição, o BPA pode ser detectado em mais de 90% as populações dos EUA e da Europa (Lin *et al*., 2023). As formas pelas quais os humanos estão expostos ao BPA incluem ingestão oral, inalação de poeira e absorção dérmica, sendo a via oral a mais predominante (Lin *et al*., 2023). No Brasil, devido aos estudos sobre as consequências da exposição ao BPA, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) proíbe, desde janeiro de 2011, a importação e produção de mamadeiras de policarbonato (com BPA) por meio de Resolução RDC n. 41/2011. No entanto, em relação à fabricação de outros produtos, não há proibição. A legislação brasileira estabelece limite máximo para transferência de BPA para alimentos (Limite de migração específica), conforme determinado por estudos toxicológicos realizados por organismos internacionais como o European Food Safety, Relatório da Autoridade e Relatório da Organização Mundial da Saúde (Ministério da Saúde, 2020), sendo o limite estabelecido pela resolução da ANVISA/DC N ANVISA/DC N◦ 88 de 29/06/2016 é de 0,6 mg/kg de alimento (Santos *et al*., 2024). Contudo, em outras partes do mundo, como Canadá, alguns estados dos EUA e países da União Europeia, o BPA está sujeito a restrições em diferentes setores comerciais (Comissão Europeia, 2011; Departamento de Agricultura, 2012; Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA, 2018; Governo do Canadá, 2018; Santos *et al*., 2024).

O BPA é um composto orgânico formado por dois anéis fenólicos conectados a uma acetona (Mutseyekwa *et al*., 2017) (Por isso a letra ¨A¨ ao final do nome). Esta estrutura fenólica ajuda o BPA a se associar aos ER (Vandenberg *et al*., 2009; Kawa *et al*., 2021). Assim, essa semelhança estrutural entre o BPA e o E2 (Figura 3) o estabelece como um desregulador endócrino em muitos sistemas onde o estrogênio é um regulador chave, como no sistema

reprodutivo. (Wehbe *et al*., 2020). Por essa razão, o BPA é conhecido como xenoestrógeno (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998; Kawa *et al*., 2021).

1.6 O BPA e seus efeitos como desregulador endócrino e na reprodução masculina

O BPA atua principalmente como agonista parcial dos receptores de estrógeno (ERα e ERβ) (Wetherill *et al*., 2007; Delfosse *et al*., 2012; Moon *et al*., 2019). Assim, o BPA é capaz de afetar o eixo HPG e impactar a síntese de esteróides (Eladak *et al*., 2015., Lan *et al*., 2017; Ullah *et al* 2018a, Li *et al*., 2021), a espermatogênese (Xie *et al*., 2016; Ullah *et al*., 2018b; Gonzalez-Rojo *et al*., 2019; Lombó & Herráez , 2021) e uma ampla série de funções fisiológicas (Maffini *et al*., 2006; Rubin, 2011; Harnett *et al*., 2021; Lee *et al*., 2021). Alguns efeitos associados ao BPA em humanos incluem doenças cardiovasculares, câncer, aborto espontâneo dentre outras (revisado em Rubin, 2011). Além disso, a exposição uterina ao BPA foi associada à redução do peso dos bebês ao nascer (Miao *et al*., 2011), alterações no comportamento infantil e no neurodesenvolvimento (Braun *et al*., 2011; Perera *et al*., 2012), e ao parto prematuro (Cantonwine *et al*., 2010). Em relação ao sistema reprodutivo masculino, alguns efeitos associados ao BPA em humanos são: a diminuição da qualidade seminal (Meeker *et al*., 2010; Li *et al*., 2011; Chen *et al*., 2022) e danos ao DNA nos espermatozoides (Meeker *et al*., 2010; Kiwitt-Cardenas *et al*., 2021).

Em roedores machos, a maioria dos estudos sobre a exposição ao BPA e seus efeitos reprodutivos confirmaram essas atividades desreguladoras do sistema endócrino (Mínguez-Alarcón *et al*., 2016). Em ratos adultos, foi demostrado que a exposição a 50 μg/L de BPA por 48 semanas, via oral, reduziu a produção espermática e as concentrações plasmáticas de testosterona; por outro lado, o estradiol foi estimulado (Ulla *et al*., 2018). Além disso, ratos recém-nascidos expostos a administrações subcutâneas de 0,01; 0,1 e 5 mg/kg/dia de BPA durante 21 dias, apresentaram aumento significativo no número de célula germinativas que sofreram apoptose e proliferação anormal, com células estacionadas em meiose (Xie *et al*., 2016). Em machos de camundongos, a injeção de 20mg/kg/dia de BPA por 7 dias, também resultou em síntese reduzida de testosterona (LI *et al*., 2021). Dobrzynska & Radzikowska (2012) demonstraram que camundongos submetidos a concentrações de 10 e 40 mg/kg/dia (via oral) por 2 semanas apresentaram queda de produção espermática e motilidade. Por fim, também foram relatados danos no DNA dos espermatozoides de ratos e camundongos em diversas condições experimentais (Revisado em Mínguez-Alarcón *et al*., 2016)

Evidências indicam que o BPA induz feminilização durante o desenvolvimento das gônadas em diversos organismos, como peixes, repteis e aves (Crain *et al*., 2007). Em peixes, também foram relatados efeitos nocivos ao sistema reprodutivo. Machos de peixes-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) alimentados duas vezes ao dia com 100 μg/kg de BPA por 1, 3 e 6 meses, apresentaram oócitos vitelogênicos nos testículos e aumento da concentração plasmática de vitelogenina (Vtg) (Gonzalez *et al*., 2021). Em fathead minnow (*Pimephales promelas*) a exposição a uma concentração variando de 1 a 1280 μg/L de BPA por 164 dias levou a alteração da proporção de cistos espermatogenicos, sugerindo inibição da espermatogênese (Sohoni *et al*., 2001). Da mesma forma, em zebrafish, um curto período de exposição (12h) a 10 pM e 10 μM de BPA, foram reportados apoptose dos espermatócitos e diminuição na proporção da área de superfície de espermátides e espermatozóides (Batista-Silva *et al*., 2022). Em truta-marrom (*Salmo trutta f. fario*) expostas a 1.75 and 2.40 μg/L de BPA em diferentes períodos reprodutivos, ocorreu redução da qualidade espermática, prejudicando a quantidade, motilidade e velocidade dos espermatozoides (Lahnsteiner *et al*., 2005). Por fim, zebrafish submetidos a diferentes concentrações de BPA e em diversos tempos de exposição, também apresentaram redução da produção e motilidade dos espermatozoides (Chen *et al*., 2017; Silveira *et al*., 2019; Mostari *et al*., 2022).

Outros efeitos observados em peixes incluem modificações transgeracionais que podem afetar a expressão de genes envolvidos na reprodução e na regulação epigenética nas gerações F1, F2 e F3 (Santangeli *et al*., 2019). Também foram registradas alterações em marcadores epigenéticos nos testículos (Gonzalez-Rojo *et al*., 2019), variações no comportamento das larvas, como ansiedade (Kinch *et al*., 2015), neurotoxicidade (Gyima *et al*., 2021) e agressividade (Gonzalez et al., 2021), além de alterações no desenvolvimento (Lee *et al*., 2021).

1.7 O desenvolvimento de substitutos ao BPA

Os extensos efeitos adversos associados ao BPA na saúde humana e vida animal levaram a produção de compostos alternativos ao uso do BPA. Esses compostos com estrutura semelhante (análogos) foram criados com o objetivo de substituir o BPA e, assim, reduzir os impactos ambientais e na saúde pública (Shamhari *et al*., 2021). Foram identificados 33 diferentes tipos de BPA alternativos (Keminer *et al*., 2020), sendo o bisfenol S (BPS), bisfenol AF (BPAF) e bisfenol F (BPF) (Figura 6) os análogos mais comuns (Arancio *et al*., 2019; Qiu *et al*., 2021; Shamhari *et al*., 2021; Czarny-Krzyminska *et al*., 2023). Assim como o BPA, os

bisfenóis alternativos são compostos orgânicos frequentemente usados para a produção de plásticos, revestimentos e resina (Rifa & Lavado, 2024). O BPA e os bisfenóis análogos podem dissociar-se dos materiais que compõem e serem transferidos para o meio ambiente e a biota (Choi & Lee, 2017; Wang *et al*., 2017). Esta transferência pode ocorrer através do aumento da temperatura, luminosidade e/ou pela degradação natural do produto ao longo do tempo (Gupta *et al*., 1996; Cao *et al*., 2013; Fang *et al*., 2019). Organismos aquáticos, como os peixes, são diretamente contaminados pelas águas (bioacumulação) provenientes de processos industriais e outras ações antrópicas de descarga de poluentes e, consequentemente, contaminam outros seres vivos através da cadeia alimentar (biomagnificação) (Wei *et al*., 2011; Wang *et al*., 2017. Barboza *et al*., 2020). Portanto, os BPs possuem características que geram grande preocupação dada a exposição contínua a estes compostos. (Wang *et al*., 2017; Fang *et al*., 2019; Barboza *et al*., 2020; Lo Nostro *et al*., 2023). Dentre os BPs, o BPS e o BPAF estão entre os análogos mais utilizados (Shamhari *et al*., 2021; Qiu *et al*., 2021), também sendo encontrados no meio ambiente. Além disso, estudos com estes análogos demonstraram que ambos podem apresentar efeitos semelhantes ou até mais nocivos que o BPA, por também apresentarem atividade estrogênica (Matsushima *et al*., 2010; Chen *et al*., 2016b; Mu *et al*., 2018; Karrer *et al*., 2018). Por conta disso, esses dois análogos foram alvos do presente estudo.

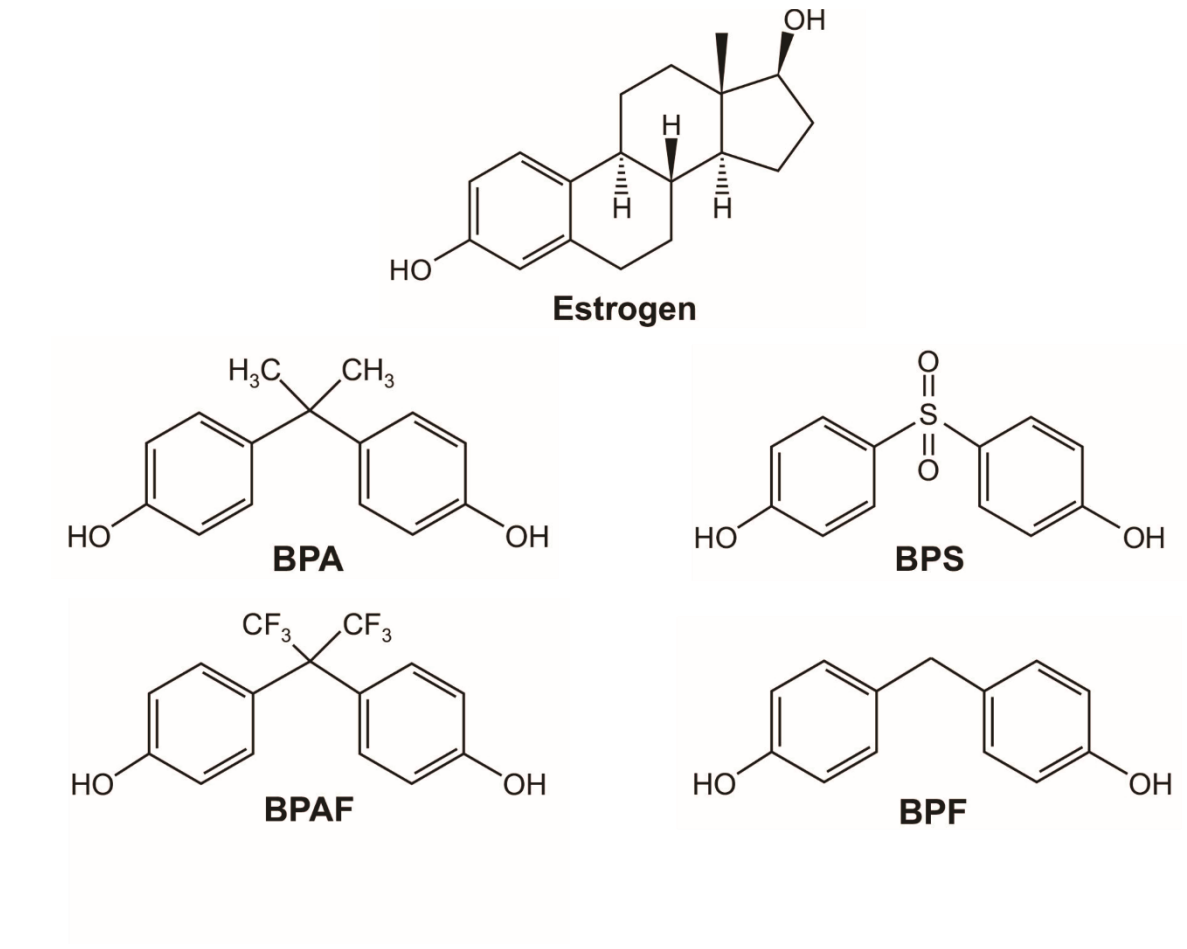


Figura 6. Estruturas químicas do estrogênio, bisfenol A (BPA) e os principais bisfenóis alternativos ao BPA: bisfenol S (BPS), bisfenol AF (BPAF) e bisfenol F (BPF) (Modificado de Winz & Suh, 2021).

1.8 Bisfenol S (BPS)

O Bisfenol S (4-hidroxifenilsulfona; BPS) compartilha uma estrutura muito semelhante ao BPA, tendo como diferença a substituição do grupo acetona por um grupo dióxido de enxofre (SO_2) (Figura 6) (Usman & Ahmad, 2016). É um composto comumente utilizado em colas epóxi, enlatados, papéis térmicos de recibos, embalagens de alimentos, jornais e etc (Ji *et al*., 2013; Tumu *et al*., 2023). O BPS é mais estável em relação à altas temperaturas e luminosidade em comparação ao BPA, substituindo-o em algumas aplicações industriais (Liao *et al*., 2012a; Choi & Lee, 2017; Fang *et al*., 2020). Face às restrições impostas ao BPA, a utilização do BPS tem intensificado, o que levou à produção global de 52 mil toneladas de BPS em 2022, e a estimativa de chegar a 81,21 mil toneladas em 2032 (Oliveira *et al*., 2024). Apesar disso, o BPS ainda tem concentrações ambientais mais baixas em comparação ao BPA, devido a sua menor produção mundial. No entanto, como é o principal substituto ao BPA (Mornagui *et al*., 2019),

além de ser mais resistente à degradação, é razoável projetar que sua concentração ambiental poderá ultrapassar a concentração do BPA (Qiu *et al*., 2019), sendo assim uma fonte de preocupação para as agências de saúde.

O BPS já apresenta significativa detecção ambiental, estando presente em sedimentos, poeiras de residências e águas de superfície (Qiu *et al*., 2019). Em ambientes aquáticos, é relatada a presença de BPS tanto em água doce como salgada, estando presente inclusive no Ártico (Nejumal *et al*., 2018). Em alguns locais da Ásia, como o Rio das Pérolas (China) e o Adyar River (Índia), o BPS já ultrapassou a concentração de BPA (Yamazaki *et al*., 2015), mostrando seu relevante potencial de acúmulo. Não obstante, estudos sobre seus efeitos ainda são incipientes. O BPS está atualmente autorizado sob o regulamento europeu (UE) n.º 10/2011 para ser utilizado como monômero em materiais plásticos em contato com alimentos, com um limite de migração específica (Specific Migration Limit; SML) de 0,05 mg/kg (European Food Safety Authority; EFSA). Foram encontrados poucos registros de restrição ou proibição de uso, a exemplo a Suíça em 2019, proibindo o uso de BPS em papéis térmicos em concentrações superiores a 0,02%. No Brasil, o BPS segue sem determinação de limites de migração específica para o alimento (Santos *et al*., 2024), bem como não há exigências para os níveis máximos de BPS (e outros bisfenóis) na água potável. No entanto, devido a preocupações com a saúde, espera-se que este composto seja incluído em futuras revisões da legislação. (Oliveira *et al*., 2024).

Já ocorre exposição generalizada ao BPS em 7 países asiáticos e nos EUA, onde a absorção dérmica diária do BPS foi estimada em 4.18 ng/kg de peso corporal/dia para a população em geral e 312 ng/kg de peso corporal/dia para indivíduos expostos ocupacionalmente (em decorrência do trabalho) (Liao *et al*., 2012a). Em amostras de urina dos EUA, Índia, Japão, Coreia do Sul, Kuwait, Malásia e Vietnam, o BPS foi detectado em todos os países, estando presente 81% das amostras, com uma ingestão diária estimada média (EDI) de 0,93 μg/dia; estes resultados indicam a substituição do BPA pelo BPS nestes países (Liao *et al*., 2012b; Usman & ahmad, 2016), sendo detectado em urina humana em frequência similar ao BPA (Rochester & Bolden, 2015). Além de presença na urina, o BPS também foi detectado em amostras humanas de sangue (Fu *et al*., 2024), leite materno (Iribarne-Duran *et al*., 2022) e placenta (Pan *et al*., 2020).

1.9 O BPS e seus efeitos como desregulador endócrino e na reprodução masculina

Dada a semelhança estrutural com o BPA, o BPS também é considerado um desregulador endócrino xenoestrogênico capaz de se ligar aos receptores de estrógeno (Mornagui *et al*., 2019; Mu *et al*., 2018), apresentando efeitos prejudiciais ao sistema endócrino de diversos organismos (revisado por Shamhari *et al*., 2021; Lee *et al*., 2021). Em comparação com os numerosos estudos sobre as toxicidades do BPA, os efeitos fisiológicos associados ao BPS são menos compreendidos (Wu *et al*., 2018). A revisão de Rochester & Bolden (2015), aponta o BPS como um desregulador endócrino que pode trazer riscos potenciais para a saúde quase na mesma ordem de grandeza que o BPA. Em humanos, Ghayda e colaboradores (2019) demonstraram uma associação negativa entre BPS e a qualidade do sêmen, visto que homens com concentrações detectáveis de BPS em amostras de urina apresentaram parâmetros de qualidade de sêmen mais baixos.

Em diferentes modelos experimentais, o BPS tem impactos consideráveis no sistema reprodutor masculino. Em mamíferos, ratos tratados por via oral com 50 µg\L do BPS diluídos em água por 48 semanas, mostraram redução da produção diária de espermatozoides, diminuição da motilidade espermática, além de testosterona reduzida e estradiol elevado (Ullah *et al*., 2018a). Corroborando este achado, ratos tratados com ingestão de 50 mg/kg/dia do BPS por 28 dias, apresentaram redução de testosterona (Ullah *et al*., 2018b), diminuição na produção de espermatozoides e danos ao DNA do espermatozoide (Ullah *et al*., 2017). Rimnacová e colaboradores (2020) também encontraram indícios de danos ao DNA nos espermatozoides de camundongos após exposição a diferentes concentrações do BPS (0.001, 1.0, ou 100 µg/kg/dia) por 8 semanas. Notaram elevação nos níveis da proteína histona γH2AX (marcador confiável de dano ao DNA), bem como outras modificações pós-traducionais nas histonas dos espermatozoides, como alterações no acetiloma e fosforiloma, apresentando indícios de que o BPS pode prejudicar a reprodução através de mecanismos epigenéticos. Por fim, ratos tratados com 150 mg/kg/dia (via oral) do BPS por 28 dias (Sahu *et al*., 2023), e camundongos e injetados com 50µg/kg ou 100 mg/kg do BPS (injetados a cada 3 dias) por 60 dias (Shi *et al*., 2017), apresentaram significativa queda de motilidade espermática.

Em peixes, os estudos se concentram majoritariamente no modelo zebrafish. Em machos adultos de zebrafish, a exposição a 50 µg/L do BPS (Ji *et al*., 2013) e 8 µg/ml, 40 µg/L e 200 µg/L (Park *et al*., 2022) por 21 dias, estimulou à produção de E2 com concomitantemente redução dos níveis de T. Além disso, Park e colaboradores (2022) encontraram redução dos

níveis plasmáticos de 11-KT. Quanto a espermatogênese, Hao e colaboradores (2022) relataram efeitos transgeracionais após a reprodução de machos e fêmeas de zebrafish expostos à 1 e 100 µg/L do BPS (a partir de 3 hpf) por 120 dias, ocorrendo modificação na proporção de cistos espermatogênicos nas gerações F0 e F1. Além disso, houve redução na produção de espermatozoides e indução de modificações epigenéticas nos testículos, como alteração nos níveis de metilação do DNA. Também foram observados impactos na expressão de genes envolvidos em metilação do DNA nos testículos das gerações F1 e F2. No entanto, ainda há carência de estudos que tenham mensurado os impactos do BPS na espermatogênese de peixes.

De modo similar ao BPA, evidências indicam que o BPS apresenta viés para a feminilização durante o desenvolvimento embrionário do zebrafish (Naderi *et al*., 2014; Santos *et al*., 2017). Naderi e colaboradores (2014) expuseram embriões de zebrafish a concentrações crescentes do BPS por 75 dias. Nas concentrações mais altas (10 e 100 µg\L), ocorreu redução da concentração plasmática de T nos machos com concomitante aumento plasmático de E2 e vitelogenina (VTG). Além disso, a exposição embrionária ao BPS aumentou a proporção fêmeas na população. Após o tratamento, também foi efetuada a reprodução dos machos e fêmeas expostos, onde foi observada queda na eclosão das larvas F1. Outras alterações no desenvolvimento dos embriões/larvas resultantes do cruzamento de parentais expostos ao BPS podem ser destacadas como a redução das taxas de eclosão e malformações na prole (Ji *et al*., 2013; Wei *et al*., 2018).

Demais efeitos observados após a exposição ao BPS em larvas de zebrafish incluem por exemplo uma variedade de malformações, como edema pericárdico, deformidades craniofaciais e da coluna espinhal etc. (Moreman *et al*., 2017), redução de comprimento (Qiu *et al*., 2018, Qiu *et al*., 2021), alteração da expressão de genes relacionados ao sistema neuroendócrino reprodutivo (Qiu *et al*., 2021), hiperatividade (Kinch *et al*., 2015) e neurotoxicidade (Gyimah *et al*., 2021).

1.10 Bisfenol AF (BPAF)

O Bisfenol AF (4,4′-hexafluoroisopropylidene) difenol; BPAF) é um difenol fluorado de estrutura semelhante ao BPA, tendo como diferença a substituição dos dois grupos metil originais do BPA por trifluorometil (-CF3) (Figura 6) (Czarny-Kryminska *et al*., 2023). É principalmente utilizado como agente “cross-linking” na fabricação de fluoropolímeros,

fluoroelastômeros, e como monômero na produção de poliamidas, poliésteres e policarbonatos (Perez *et al*., 1998; Feng *et al*., 2012; Li *et al*., 2020a), conferindo resistência a elevadas temperaturas a produtos químicos (Zhang *et al*., 2013). Estas valências tornam o BPAF apropriado para produtos que exigem elevada estabilidade e performance, como polímeros de embalagens de alimentos, eletrônicos, fibra ótica, revestimento para componentes aeroespaciais e retardantes de chamas (Zhang *et al*., 2013; Banaderakhshan *et al*., 2022; Czarny-Krzyminska *et al*., 2023; Rifa & Lavado, 2024).

O BPAF é mais estável e resistente à altas temperaturas e luminosidade em relação ao BPA e não sofre degradação por bactérias pela falta de nutrientes no composto, tornando-o mais difícil de biodegradar em relação ao BPA (Frankowski *et al*., 2020). Fato preocupante devido ao progressivo aumento de sua produção. Nos Estados Unidos, por exemplo, a produção anual pode chegar à 500.000 libras (226796 kg) (Pinto *et al*., 2019). Somado a isto, amostras de águas residuais e de lamaçais em Xiamen (China) foram coletadas para a verificação da concentração de BPs dissolvidas e adsorvidas nesses locais. Os dados sobre a análise da eficiência de remoção desses compostos mostraram que cinco tipos de BPs (BPA, BPAF, BPE, BPF e BPS) foram amplamente detectados. No entanto, ainda que a concentração detectada de BPAF tenha sido uma das menores dentre os BPs encontrados, apenas o BPAF e o BPE (bisfenol E) foram totalmente resistentes ao WWTPs ("Wastewater treatment plant"), tratamento para águas residuais (Sun *et al*., 2017).

O BPAF está no inventário de substâncias do Regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) da União Europeia, listado como suspeito de perigo para o ambiente aquático e como persistente no ambiente. Nos Estados Unidos, está no inventário da Lei de Controle de Substâncias Tóxicas (TSCA) (National toxicological program, 2022). No entanto, não foram encontrados limites de migração específica para os alimentos ou ingestão diária tolerável.

Vários estudos indicam que o BPAF representa uma ameaça potencial à saúde pública e a diferentes ecossistemas (Pan *et al*., 2020; Czarny-Krzyminska *et al*., 2023; Chen *et al*., 2024; Xue *et al*., 2024). Cerca de 46% das amostras de esgoto dos Estados Unidos foram detectadas com BPAF na pesquisa da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA). Além disso, estudos realizados na Coréia do Sul identificaram BPAF em sedimentos de áreas industrializadas (Liao *et al*., 2012c; Shi *et al*., 2016) e em 76% das amostras de poeiras coletadas em residências, escritórios e laboratórios (Liao *et al*., 2012c).

Na China, concentrações de BPAF atingiram microgramas por kg em sedimentos e solos próximos a ecossistemas (Song *et al*., 2012; Shi *et al*., 2016). Em águas de superfície, o BPAF foi encontrado em rios (Yang *et al*., 2014a; Jin & Zhu, 2016; Zhao *et al*., 2020), lagos (Liu *et al*., 2017; Zhao *et al*., 2020; Russo *et al*., 2021) e mares (Xie *et al*., 2022; Gao *et al*., 2023). Além disso, o BPAF já foi detectado em água encanada e garrafas d'água voltadas para o consumo humano (Russo *et al*., 2022) Na população em geral, o BPAF já foi detectado em amostras de urina (Yang *et al*., 2014b; Rocha *et al*., 2016), sangue (Jin *et al*., 2018; Li *et al*., 2020b), leite materno (Jin *et al*., 2020) e placenta (detectado em 100% das amostras coletadas na China) (Pan *et al*., 2020).

1.11 O BPAF e seus efeitos como desregulador endócrino na reprodução masculina

O BPAF apresenta capacidade de se ligar aos receptores de estrógeno (Wang *et al*., 2017; Pinto *et al*., 2019; Li *et al*., 2012), sendo, portanto, considerado um desregulador endócrino xenoestrogênico (Xue *et al*., 2024; Boychenko *et al*., 2024). Em ensaio de ativação de receptores com células humanas, o BPAF demonstrou ser 20 e 48 vezes mais potente que o BPA em se ligar aos receptores ERα e ERβ, respectivamente (Matsushima *et al*., 2010). Além disso, Mu e colaboradores (2018), demonstraram em um estudo *in sílico* que o BPAF apresenta maior potencial de ligação aos receptores de estrógeno em relação a outros bisfenóis analisados (BPA, BPS e BPF) em embriões de zebrafish. Alinhado a este estudo, Kojima e colaboradores (2019) demonstraram em um ensaio de transativação *in vitro* em cultura de células humanas, que o BPAF apresentou maior afinidade como agonista dos receptores de estrógeno (ERα e ERβ) em relação a outros 7 tipos de bisfenóis (dentre eles o BPA). Ou seja, potencialmente, podem exercer efeitos biológicos com maior intensidade que o BPA (Lei *et al*., 2016).

Considerando isso, diversos efeitos foram relatados na reprodução masculina em diversos organismos modelo. Apoiado por dados morfológicos e moleculares, o BPAF teve um efeito feminilizante durante o desenvolvimento das gônadas em girinos (*Xenophus laevis*) (Cai *et al*., 2020) e galináceos (*Gallus gallus domesticus*) (Mentor *et al*., 2020). Girinos (*X. laevis*) expostos a 1, 10 e 100 nM do BPAF (0,34, 3,36 e 33,6 mg/L) apresentaram inibição da diferenciação testicular durante o desenvolvimento e inibição da expressão dos genes *dmrt1*, *amh* e *sox9*, relacionados a diferenciação sexual masculina. Efeito semelhante também foi observado no tratamento de machos de *X. laevis* com estradiol (Cai *et al*., 2020). Nos galináceos, embriões geneticamente machos expostos a 210 e 520 nmol/g desenvolveram

testículos com características de ovários (ovotestis). Mentor e colaboradores (2020), sugerem que o BPAF é pelo menos tão potente quanto BPA na indução de efeitos semelhantes aos do estrogênio em embriões de galinha.

Em mamíferos, estudos demonstraram que o BPAF é capaz de afetar a síntese de hormônios e a espermatogênese. Wu e colaboradores (2019), encontraram efeitos adversos na estrutura testicular, qualidade espermática e maturidade sexual de camundongos alimentados com 5, 20, 50 mg/kg/dia de BPAF por 28 dias consecutivos. Além desses efeitos fisiológicos, o BPAF impactou a regulação epigenética dos espermatozoides através da hipermetilação de H3K27m3. Apontando o BPAF como potencial agente capaz de influenciar o padrão epigenético na descendência. Fêmeas de camundongos alimentadas com 300 μg/kg durante a gravidez, originaram prole com redução de níveis plasmáticos de T e menor rendimento e qualidade espermática (Xue *et al*., 2023). Convergindo com este estudo, Feng e colaboradores (2012) em ratos tratados (via oral) com 200 mg/kg/dia do BPAF por 14 dias, encontraram T reduzida e diminuição da expressão de genes envolvidos em sua biossíntese, como SR-B1, StAR, P450scc e 17β -HSD, bem como redução de suas respectivas proteínas nos testículos. Além disso, as concentrações do BPAF presentes nos testículos foram diretamente proporcionais às doses administradas via oral, demonstrando sua capacidade de acúmulo nos testículos (Feng *et al*., 2012).

Em peixes, machos de zebrafish de 2 meses de idade tratados com 0,05; 0,25 e 1 mg/L de BPAF por 28h, tiveram diminuição dose dependente na testosterona, e aumento de E2 na exposição de 1 mg/L. Além disso, na concentração de 1 mg/L de BPAF, houve presença de áreas nos testículos contendo apenas células de Sertoli (Yang *et al*., 2016). No entanto, estudos que busquem elucidar os efeitos do BPAF na espermatogênese e qualidade espermática de peixes são escassos. Em embriões/larvas de zebrafish, os efeitos do BPAF variam desde desregulação endócrina (Tang *et al*., 2015; Shi *et al*., 2015; Qiu *et al*., 2021) até alterações morfológicas subletais ou letais (Moreman *et al*., 2017; Mu *et al*., 2018; Gao *et al*., 2022). Em larvas de zebrafish, o BPAF foi capaz de promover maior estímulo da atividade estrogênica que o BPA (Song *et al*., 2014; Moreman *et al*., 2017; Gao *et al*., 2022). Alinhando a este dado, Qiu e colaboradores (2021) observaram aumento nos níveis de E2 em adultos de zebrafish tratados, desde a fertilização, com 1 e 100 μg/L de BPAF até 120 hpf. Por fim, Shi e colaboradores (2015) após exposição de embriões de zebrafish (4 hpf) com 25 e 125 μg/L de BPAF até a fase adulta (120 hpf), encontraram redução significativa de T nos machos. Além disso, os machos tratados com a maior concentração (125 μg/L), tiveram redução da expressão de genes envolvidos na

esteroidogênese, especialmente o gene *cyp17a1*. Além disso, houve diminuição na taxa de fertilidade masculina observada neste grupo, indicando perda na qualidade dos espermatozoides.

Zebrafish (D. rerio) como modelo experimental

O *D. rerio* (zebrafish) pertence à família Cyprinidae e à ordem Cypriniforme. Como modelo experimental, apresenta uma série de características vantajosas: possui fácil manejo; baixo custo de manutenção e facilidade de aquisição; pode ser mantido em alta densidade populacional; apresenta fertilização externa com geração de grande número de indivíduos; embriões transparentes que permitem fácil visualização e monitoramento durante o desenvolvimento; rápida maturação sexual; e genoma totalmente sequenciado (McGonnel & Fowkes, 2006; Bauer *et al*., 2021; Choi *et al*., 2021). O zebrafish tem se tornado excelente modelo experimental para pesquisas cientificas experimentais e biomédicas em vertebrados. Este animal vem sendo utilizado como modelo experimental em nosso grupo de pesquisa para compreender aspectos reprodutivos, como a regulação do nicho espermatogonial e a suas consequências na espermatogênese, bem como efeitos de substâncias na biologia do desenvolvimento.

Justificativa

Devido aos diversos impactos ambientais e a saúde associados ao BPA, BPs alternativos foram desenvolvidos como tentativa de substituí-lo. Dentre estes BPs alternativos, foram escolhidos como alvo deste estudo o BPS e o BPAF. O BPS foi selecionado por ser o principal substituto ao BPA. O BPAF por conta de seu maior potencial estrogênico descrito na literatura em relação aos demais bisfenóis, além de seu uso frequente e presença ambiental significativa, também estando entre os alternativos de uso e produção mais comuns. Porém, tanto o BPS como o BPAF também estão relacionados à desregulação endócrina, sendo responsáveis por induzir respostas estrogênicas, e assim, interferir no eixo HPG. Todavia, o potencial de ambos como desreguladores endócrinos e seus possíveis danos aos organismos ainda são pouco estudados, sobremaneira em peixes. Desta forma, dada a indiscutível importância da reprodução para a perpetuação da espécie, e o fato de que mesmo pequenas perturbações na fisiologia dos embriões podem afetar todo o seu desenvolvimento e viabilidade; o presente trabalho avaliou os impactos do BPS e BPAF sobre ambos os aspectos. Visto ainda, que estes contaminantes têm poucas restrições de uso em praticamente todo o mundo e apresentam

intensificada e constante produção industrial, com descarte negligenciado. Além de já estarem presentes tanto em corpos d'agua doce quanto salgada, contaminando os organismos aquáticos e a população humana; faz-se necessário e somatório o presente estudo. Esta tese, contribui com a elucidação dos aspectos relevantes apontados, através de abordagens descritas a seguir: O **Capítulo 1**, versa sobre as ações diretas do BPS e BPAF nos testículos, via explantes testiculares (*ex vivo*), com avaliações histomorfométricas e de expressão gênica. Neste capítulo, foi adotado um range crescente de concentrações, de modo a testar a resposta dos testículos a esses contaminantes em diferentes condições. Os **Capítulos 2** e **3** discutem os efeitos sistêmicos dos contaminantes através da exposição, *in vivo*, a concentrações ambientalmente relevantes. Sendo o **Capítulo 2** dedicado ao BPS e o **Capítulo 3** ao BPAF. Nestes capítulos foram analisados: Produção de andrógeno (11-KT), espermatogênese, qualidade espermática e reprodução; adicionalmente, embriões diretamente expostos aos contaminantes também foram avaliados. É importante destacar que, nos estudos *in vivo*, foram adotadas concentrações diferentes para o BPS e o BPAF, devido às suas distintas concentrações ambientais relatadas na literatura. O BPS é mais frequente, e geralmente encontrado em maiores quantidades em relação ao BPAF. Este aspecto será abordado com mais detalhes nos capítulos. Por conta disso, a presente tese não tem o objetivo de comparar ambos os contaminantes entre si. Por fim, buscamos com este trabalho, respaldar e alertar sobre a necessidade de novas regulamentações e restrições de uso.

Objetivo Geral

Avaliar parâmetros reprodutivos em machos de zebrafish (*D. rerio*) expostos a diferentes concentrações de BPS e BPAF em condições ex *vivo,* bem como em concentração ambientalmente relevante *in vivo.*

Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos do BPS e BPAF na dinâmica da espermatogênese e perfil de transcritos em explantes testiculares (*ex vivo*);

2. Avaliar os efeitos do BPS *in vivo* sobre os níveis de 11-KT (plasmáticos e testiculares), na dinâmica da espermatogênese e no perfil de transcritos dos testículos, assim como a produção de espermatozoides e qualidade espermática;

3. Avaliar a prole de machos expostos ao BPS com fêmeas não tratadas para investigar possíveis efeitos intergeracionais na informação paterna, avaliando a eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e perfil de transcritos dos embriões/larvas (F1);

4. Avaliar os impactos da exposição direta ao BPS na eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e perfil de transcritos em embriões/larvas;

5. Avaliar os efeitos do BPAF *in vivo* sobre os níveis de 11-KT (plasmáticos e testiculares), na dinâmica da espermatogênese e no perfil de transcritos dos testículos, assim como a produção de espermatozoides e qualidade espermática;

6. Avaliar a prole de machos expostos ao BPAF com fêmeas não tratadas para investigar possíveis efeitos intergeracionais na informação paterna, avaliando a eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e perfil de transcritos dos embriões/larvas (F1);

7. Avaliar os impactos da exposição direta ao BPAF na eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e perfil de transcritos em embriões/larvas.

Referências

Abou Ghayda, R., Williams, P. L., Chavarro, J. E., Ford, J. B., Souter, I., Calafat, A. M., ... & Mínguez-Alarcón, L. (2019). Urinary bisphenol S concentrations: Potential predictors of and associations with semen quality parameters among men attending a fertility center. *Environment international*, *131*, 105050.

Andersson, E., Nijenhuis, W., Male, R., Swanson, P., Bogerd, J., Taranger, G. L., & Schulz, R. W. (2009). Pharmacological characterization, localization and quantification of expression of gonadotropin receptors in Atlantic salmon (Salmo salar L.) ovaries. *General and comparative endocrinology*, 163(3), 329-339.

Arancio, A. L., Cole, K. D., Dominguez, A. R., Cohenour, E. R., Kadie, J., Maloney, W. C., ... & Schuh, S. M. (2019). Bisphenol A, Bisphenol AF, di-n-butyl phthalate, and 17β-estradiol have shared and unique dose-dependent effects on early embryo cleavage divisions and development in Xenopus laevis. *Reproductive Toxicology*, 84, 65-74.

Assis, L. H. C, de Nóbrega, R. H., Gómez-González, N. E., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2018). Estrogen-induced inhibition of spermatogenesis in zebrafish is largely reversed by androgen. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(4), 273-284.

Banaderakhshan, R., Kemp, P., Breul, L., Steinbichl, P., Hartmann, C., & Fürhacker, M. (2022). Bisphenol A and its alternatives in Austrian thermal paper receipts, and the migration from reusable plastic drinking bottles into water and artificial saliva using UHPLC-MS/MS. *Chemosphere*, *286*, 131842.

Barboza, L. G. A., Cunha, S. C., Monteiro, C., Fernandes, J. O., & Guilhermino, L. (2020). Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers. *Journal of hazardous materials*, 393, 122419.

Batley, G. E., & Campbell, P. G. C. (2022). Metal contaminants of emerging concern in aquatic systems. *Environ Chem* 19 (1): 23–40.

Bauer, B., Mally, A., & Liedtke, D. (2021). Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *International journal of molecular sciences*, *22*(24), 13417.

Ben-Jonathan, N., & Steinmetz, R. (1998). Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *9*(3), 124-128.

Borella, M. I., Chehade, C., Costa, F. G., De Jesus, L. W. O., Cassel, M., & Batlouni, S. R. (2020). The brain-pituitary-gonad axis and the gametogenesis. In Biology and physiology of freshwater neotropical fish (pp. 315-341). *Academic Press*.

Braun, J. M., Kalkbrenner, A. E., Calafat, A. M., Yolton, K., Ye, X., Dietrich, K. N., & Lanphear, B. P. (2011). Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics*, *128*(5), 873-882.

Canada, 2018b. Risk management action milestones for bisphenol A. https://www.canada.ca/en/health-canada/services/chemical substances/challenge/batch-2/ bisphenol-a/risk-management-action-milestones.html.

Cantonwine, D., Meeker, J. D., Hu, H., Sánchez, B. N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-García, A., ... & Téllez-Rojo, M. M. (2010). Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental health*, 9, 1-7.

Cao, G., He, R., Cai, Z., & Liu, J. (2013). Photolysis of bisphenol S in aqueous solutions and the effects of different surfactants. Reaction Kinetics, *Mechanisms and Catalysis*, 109, 259-271.

Careghini, A., Mastorgio, A. F., Saponaro, S., & Sezenna, E. (2015). Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5711-5741.

Cavaco, J. E. B., Vilrokx, C., Trudeau, V. L., Schulz, R. W., & Goos, H. J. (1998). Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (Clarias gariepinus). American Journal of Physiology-Regulatory, *Integrative and Comparative Physiology*, 275(6), R1793-R1802.

Chauvigné, F., Verdura, S., Mazón, M. J., Duncan, N., Zanuy, S., Gómez, A., & Cerdà, J. (2012). Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone mediate the androgenic pathway in Leydig cells of an evolutionary advanced teleost. *Biology of Reproduction*, 87(2), 35-1.

Chen, L. Y., Willis, W. D., & Eddy, E. M. (2016a). Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proceedings of the national academy of sciences*, 113(7), 1829-1834.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016b). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity□ a review. *Environmental science & technology*, 50(11), 5438-5453.

Chen, H., Wang, Y., Ge, R., & Zirkin, B. R. (2017). Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*, 445, 65-73.

Chen, P. P., Liu, C., Zhang, M., Miao, Y., Cui, F. P., Deng, Y. L., ... & Zeng, Q. (2022). Associations between urinary bisphenol A and its analogues and semen quality: A cross-sectional study among Chinese men from an infertility clinic. *Environment international*, *161*, 107132.

Choi, Y. J., & Lee, L. S. (2017). Aerobic soil biodegradation of bisphenol (BPA) alternatives bisphenol S and bisphenol AF compared to BPA. *Environmental science & technology*, 51(23), 13698-13704.

Choi, T. Y., Choi, T. I., Lee, Y. R., Choe, S. K., & Kim, C. H. (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. Experimental & Molecular Medicine, 53(3), 310-317.

Colborn, T., Vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*, *101*(5), 378-384.

Cottone, E., Pomatto, V., & Bovolin, P. (2013). Role of the endocannabinoid system in the central regulation of nonmammalian vertebrate reproduction. *International journal of endocrinology*, 2013(1), 941237.

Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette Jr, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive toxicology*, 24(2), 225-239.

Czarny-Krzymińska, K., Krawczyk, B., & Szczukocki, D. (2023). Bisphenol A and its substitutes in the aquatic environment: Occurrence and toxicity assessment. *Chemosphere*, 315, 137763.

De Rooij, D. G. (2006). Regulation of spermatogonial stem cell behavior in vivo and in vitro. *Animal Reproduction (AR)*, 3(2), 130-134.

De Rooij, D. G. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microscopy research and technique*, 72(8), 580-585.

De Waal, P. P., Wang, D. S., Nijenhuis, W. A., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2008). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (Danio rerio) testis. *Reproduction*, 136(2), 225.

De Waal, P. P., Leal, M. C., Garcia-Lopez, A., Liarte, S., De Jonge, H., Hinfray, N., ... & Bogerd, J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *Journal of Endocrinology*, 202(2), 287.

Delbes, G., Blázquez, M., Fernandino, J. I., Grigorova, P., Hales, B. F., Metcalfe, C., ... & Marlatt, V. (2022). Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals. *Environmental research*, *204*, 112040.

DELFOSSE, V. et al. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk. assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 109, n. 37, p. 14930–14935, 2012.

Department of Health and Human Services, 2005. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. *Center For The Evaluation of Risks To Human Reproduction*

Dobrzyńska, M. M., & Radzikowska, J. (2013). Genotoxicity and reproductive toxicity of bisphenol A and X-ray/bisphenol A combination in male mice. *Drug and chemical toxicology*, *36*(1), 19-26.

Doretto, L. B., Butzge, A. J., Nakajima, R. T., Martinez, E. R., de Souza, B. M., Rodrigues, M. D. S., ... & Nóbrega, R. H. (2022). Gdnf acts as a germ cell-derived growth factor and regulates the zebrafish germ stem cell niche in autocrine-and paracrine-dependent manners. *Cells*, 11(8), 1295.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., ... & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility*, 103(1), 11-21.

European Food Safety Authority (EFSA), FitzGerald, R., Loveren, H. V., Civitella, C., Castoldi, A. F., & Bernasconi, G. (2020). *Assessment of new information on Bisphenol S (BPS) submitted in response to the Decision 1 under REACH Regulation (EC) No 1907/2006* (Vol. 17, No. 4, p. 1844E).

Fang, Z., Gao, Y., Wu, X., Xu, X., Sarmah, A. K., Bolan, N., ... & Wang, H. (2020). A critical review on remediation of bisphenol S (BPS) contaminated water: Efficacy and mechanisms. *Critical reviews in environmental science and technology*, 50(5), 476-522.

Farto, c., Athayde Júnior, g. b., Sena, r., & Rosenhaim, R. (2020). Contaminantes de preocupação emergente no Brasil na década 2010-2019-Parte II: tecnologias de tratamento e eficiências de remoção em ETES e ETAS. *Revista de Gestão de Água da América Latina*, *18*(1), 7-0.

Fenichel, P., Chevalier, N., & Brucker-Davis, F. (2013). Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. In Annales d'endocrinologie (Vol. 74, No. 3, pp. 211-220). *Elsevier Masson*.

Forner-Piquer, I., Fakriadis, I., Mylonas, C. C., Piscitelli, F., Di Marzo, V., Maradonna, F., ... & Carnevali, O. (2019). Effects of dietary bisphenol A on the reproductive function of gilthead sea bream (Sparus aurata) testes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5003.

Fu, Z., Jin, H., Mao, W., & Hu, Z. (2024). Conjugated bisphenol S metabolites in human serum and whole blood. *Chemosphere*, 357, 142082.

García-Lopez, A., Bogerd, J., Granneman, J. C., van Dijk, W., Trant, J. M., Taranger, G. L., & Schulz, R. W. (2009). Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology*, 150(1), 357-365.

González-Rojo, S., Lombó, M., Fernández-Díez, C., & Herráez, M. P. (2019). Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, 248, 368-379.

Gonzalez, J. A., Histed, A. R., Nowak, E., Lange, D., Craig, S. E., Parker, C. G., ... & Rhodes, J. S. (2021). Impact of bisphenol-A and synthetic estradiol on brain, behavior, gonads and sex hormones in a sexually labile coral reef fish. *Hormones and Behavior*, 136, 105043.

Gulley, A. L., Nassar, N. T., & Xun, S. (2018). China, the United States, and competition for resources that enable emerging technologies. *Proceedings of the national academy of sciences*, 115(16), 4111-4115.

Gupta, M. C., & Viswanath, S. G. (1996). Role of metal oxides in the thermal degradation of bisphenol a polycarbonate. *Journal of thermal analysis*, 46, 1671-1679.

Gyimah, E., Xu, H., Dong, X., Qiu, X., Zhang, Z., Bu, Y., & Akoto, O. (2021). Developmental neurotoxicity of low concentrations of bisphenol A and S exposure in zebrafish. *Chemosphere*, 262, 128045.

Hao, L., Ru, S., Qin, J., Wang, W., Zhang, J., Wei, S., ... & Zhang, X. (2022). Transgenerational effects of parental bisphenol S exposure on zebrafish (Danio rerio) reproduction. *Food and Chemical Toxicology*, 165, 113142.

Harnett, K. G., Chin, A., & Schuh, S. M. (2021). BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216, 112210.

Heckert, L. L., & Griswold, M. D. (1991). Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Molecular Endocrinology*, 5(5), 670-677.

Heckert, L., & Griswold, M. D. (1993). Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Progress in Hormone Research*, 61-77.

Hess, R. A., & De Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 1-15.

http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm064437. 2018.

Iribarne-Durán, L. M., Peinado, F. M., Freire, C., Castillero-Rosales, I., Artacho-Cordón, F., & Olea, N. (2022). Concentrations of bisphenols, parabens, and benzophenones in human breast milk: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment*, *806*, 150437.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, 47(15), 8793-8800.

Ji, Z., Liu, J., Sakkiah S., Guo, W and Hong, H (2021). BPA replacement compounds: Current Status and Perspectives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering 9* (6), 2433-2446

Karrer, C., Roiss, T., von Goetz, N., Gramec Skledar, D., Peterlin Mašič, L., & Hungerbühler, K. (2018). Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of the bisphenols BPA, BPS, BPF, and BPAF with new experimental metabolic parameters: comparing the pharmacokinetic behavior of BPA with its substitutes. *Environmental health perspectives*, 126(7), 077002.

Kawa, I. A., Fatima, Q., Mir, S. A., Jeelani, H., Manzoor, S., & Rashid, F. (2021). Endocrine disrupting chemical Bisphenol A and its potential effects on female health. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *15*(3), 803-811.

Keminer, O., Teigeler, M., Kohler, M., Wenzel, A., Arning, J., Kaßner, F., ... & Eilebrecht, E. (2020). A tiered high-throughput screening approach for evaluation of estrogen and androgen receptor modulation by environmentally relevant bisphenol A substitutes. *Science of the Total Environment*, *717*, 134743.

Kinch, C. D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J. H., Habibi, H. R., & Kurrasch, D. M. (2015). Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(5), 1475-1480.

Kiwitt-Cárdenas, J., Adoamnei, E., Arense-Gonzalo, J. J., Sarabia-Cos, L., Vela-Soria, F., Fernández, M. F., ... & Torres-Cantero, A. M. (2021). Associations between urinary concentrations of bisphenol A and sperm DNA fragmentation in young men. *Environmental Research*, *199*, 111289.

Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., ... & Yoshinari, K. (2019). Profiling of bisphenol A and eight of its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology*, *413*, 48-55.

Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. (2020). Environmental endocrine-disrupting chemical exposure: role in non-communicable diseases. *Frontiers in public health*, *8*, 553850.

Lacerda, S. M. S. N., Aponte, P. M., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Silva, M., & França, L. R. (2018). An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Animal Reproduction (AR)*, 9(4), 798-88.

Lan, H. C., Wu, K. Y., Lin, I. W., Yang, Z. J., Chang, A. A., & Hu, M. C. (2017). Bisphenol A disrupts steroidogenesis and induces a sex hormone imbalance through c-Jun phosphorylation in Leydig cells. *Chemosphere*, 185, 237-246.

Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2009). Histological and stereological evaluation of zebrafish (Danio rerio) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of reproduction*, 81(1), 177-187.

Lee, J., Moon, K. W., & Ji, K. (2021). Systematic review of exposure to bisphenol A alternatives and its effects on reproduction and thyroid endocrine system in zebrafish. *Applied Sciences*, 11(4), 1837.

Li, D. K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., ... & Yuan, W. (2011). Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and sterility*, 95(2), 625-630.

Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., & Korach, K. S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environmental health perspectives*, 120(7), 1029-1035.

Li, R., Liu, S., Qiu, W., Yang, F., Zheng, Y., Xiong, Y., ... & Zheng, C. (2020a). Transcriptomic analysis of bisphenol AF on early growth and development of zebrafish (Danio rerio) larvae. *Environmental Science and Ecotechnology*, 4, 100054.

Li, A., Zhuang, T., Shi, W., Liang, Y., Liao, C., Song, M., & Jiang, G. (2020b). Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Science of the total environment*, *707*, 136100.

Li, C., Zhang, L., Ma, T., Gao, L., Yang, L., Wu, M., ... & Chen, H. (2021). Bisphenol A attenuates testosterone production in Leydig cells via the inhibition of NR1D1 signaling. *Chemosphere*, *263*, 128020.

Liao, C., Liu, F., & Kannan, K. (2012a). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science & technology*, *46*(12), 6515-6522.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H. B., ... & Kannan, K. (2012b). Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental science & technology*, *46*(12), 6860-6866.

Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H. B., Nakata, H., Wu, Q., & Kannan, K. (2012c). Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental science & technology*, *46*(16), 9138-9145.

Lima, D. R. S., Tonucci, M. C., Libânio, M., & Aquino, S. F. (2017). Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 22(6), 1043-1054.

Lima, E. F., & Montagner, C. C., & Cantusio Neto, R. (2018). Determinação da capacidade de remoção de contaminantes emergentes em estação produtora de água de reúso que emprega o sistema de tratamento MBR. *In Anais do 48º Congresso Nacional de Saneamento da ASSEMAE*. Fortaleza, Ceará

Lin, M. H., Lee, C. Y., Chuang, Y. S., & Shih, C. L. (2023). Exposure to bisphenol A associated with multiple health-related outcomes in humans: An umbrella review of systematic reviews with meta-analyses. *Environmental Research*, 116900.

Lo Nostro, F. L; Costa, D. F; Nóbrega, R. H; Cuña, R (2023). EDCs: focus on male fish reproductive alterations. *Environmental Contaminants And Endocrine Health*, [S.L.], p. 269-281.

Lombó, M., & Herráez, M. P. (2021). Paternal inheritance of bisphenol A cardiotoxic effects: the implications of sperm epigenome. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2125.

Ma, Y., He, X., Qi, K., Wang, T., Qi, Y., Cui, L., ... & Song, M. (2019). Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *Journal of Environmental Sciences*, 77, 210-217.

Maekawa, M., Kamimura, K., & Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology*, 59(1), 1-13.

Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and cellular endocrinology*, 254, 179-186.

Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., & Shimohigashi, Y. (2010). Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ERα but a highly specific antagonist for ERβ. *Environmental health perspectives*, 118(9), 1267-1272.

McGonnell, I. M., & Fowkes, R. C. (2006). Fishing for gene function–endocrine modelling in the zebrafish. *Journal of Endocrinology*, *189*(3), 425-439.

McLean, D. J. (2005). Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell and tissue research*, 322, 21-31.

Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, T. L., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., ... & Hauser, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive toxicology*, *30*(4), 532-539.

Miao, M., Yuan, W., Zhu, G., He, X., & Li, D. K. (2011). In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reproductive toxicology*, *32*(1), 64-68.

Mínguez-Alarcón, L., Hauser, R., & Gaskins, A. J. (2016). Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertility and sterility*, *106*(4), 864-870.

Miura, T., & Miura, C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish physiology and biochemistry*, 28, 181-186.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (Anguilla japonica). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5774-5778.

MOON, Min Kyong. Concern about the Safety of Bisphenol A Substitutes. *Diabetes & Metabolism Journal*, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 46, 2019. Korean Diabetes Association.

Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., & Tyler, C. R. (2017). Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environmental science & technology*, 51(21), 12796-12805.

Mornagui, B., Rezg, R., Repond, C., & Pellerin, L. (2019). Effects of bisphenol S, a major substitute of bisphenol A, on neurobehavioral responses and cerebral monocarboxylate transporters expression in mice. *Food and chemical toxicology*, 132, 110670.

Mostari, M. H., Rahaman, M. M., Akhter, M. A., Ali, M. H., Sasanami, T., & Tokumoto, T. (2022). Transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues and sperm motility. *Reproductive Toxicology*, 109, 31-38.

Mu, X., Huang, Y., Li, X., Lei, Y., Teng, M., Li, X., ... & Li, Y. (2018). Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. *Environmental science & technology*, 52(5), 3222-3231.

Mutseyekwa, M. E., Doğan, Ş., & Pirgalıoğlu, S. (2017). Ozonation for the removal of bisphenol A. *Water Science and Technology*, *76*(10), 2764-2775.

Naderi, M., Wong, M. Y., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*, 148, 195-203.

National Toxicology Program. (2022). NTP Developmental and Reproductive Toxicity Technical Report on the Modified One-Generation Study of 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (CASRN 131-57-7) Administered in Feed to Sprague Dawley (Hsd: Sprague Dawley® SD®) Rats with Prenatal and Reproductive Performance Assessments in F1 Offspring.

Nawaz, F., Ullah, A., Ara, C., Mehboob, M., & Idnan, M. (2021). The Assessment of Histopathological Impacts of Bisphenol-A on the Liver in Mice Model. *RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences*, *12*(2), 90-97.

Nejumal, K. K., Dineep, D., Mohan, M., Krishnan, K. P., Aravind, U. K., & Aravindakumar, C. T. (2018). Presence of bisphenol S and surfactants in the sediments of Kongsfjorden: a negative impact of human activities in Arctic?. *Environmental monitoring and assessment*, 190, 1-8.

Nóbrega, R. H., & Lareyre, J. J. (2024). Testicular function and hormonal regulation in fishes. In Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 1 (pp. 63-90). *Academic Press*.

Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish physiology and biochemistry*, *35*, 197-206.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., & Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PloS one*, 5(9), e12808.

Nóbrega, R. H., Morais, R. D. V. D. S., Crespo, D., De Waal, P. P., De França, L. R., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2015). Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology*, 156(10), 3804-3817.

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*, 24(1), 263-286.

Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., & Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, Anguilla japonica. *Biology of Reproduction*, 77(6), 970-977.

Oliveira, N. D. S., Ginoris, Y. P., & Ratnaweera, H. (2024). Removal of Bisphenol S (BPS) by Adsorption on Activated Carbons Commercialized in Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *21*(6), 792.

Pan, Y., Deng, M., Li, J., Du, B., Lan, S., Liang, X., & Zeng, L. (2020). Occurrence and maternal transfer of multiple bisphenols, including an emerging derivative with unexpectedly high concentrations, in the human maternal–fetal–placental unit. Environmental science & technology, 54(6), 3476-3486.

Park, C. B., Kim, G. E., On, J., Pyo, H., Park, J. W., & Cho, S. H. (2022). Sex-specific effects of bisphenol S with tissue-specific responsiveness in adult zebrafish: The antiandrogenic and antiestrogenic effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113102.

Paull, J. (2013). The Rachel Carson letters and the making of Silent Spring. *Sage Open*, *3*(3), 2158244013494861.

Perera, F., Vishnevetsky, J., Herbstman, J. B., Calafat, A. M., Xiong, W., Rauh, V., & Wang, S. (2012). Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental health perspectives*, 120(8), 1190-1194.

Previšić, A., Rožman, M., Mor, J. R., Acuña, V., Serra-Compte, A., Petrović, M., & Sabater, S. (2020). Aquatic macroinvertebrates under stress: Bioaccumulation of emerging contaminants and metabolomics implications. *Science of the total environment,* 704, 135333.

Qiu, W., Shao, H., Lei, P., Zheng, C., Qiu, C., Yang, M., & Zheng, Y. (2018). Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during zebrafish early development. *Chemosphere*, 194, 1-8.

Qiu, W., Zhan, H., Hu, J., Zhang, T., Xu, H., Wong, M., ... & Zheng, C. (2019). The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 173, 192-202.

Qiu, W., Liu, S., Chen, H., Luo, S., Xiong, Y., Wang, X., ... & Wang, K. J. (2021). The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms. *Journal of hazardous materials*, 406, 124303.

Rajakumar, A., & Senthilkumaran, B. (2020). Steroidogenesis and its regulation in teleost-a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, *46*(3), 803-818.

Rifa, R. A., & Lavado, R. (2023). Unveiling the next generation of bisphenol analogs and their impact on human health using in vitro methods. *Emerging Contaminants*, 100296.

Řimnáčová, H., Štiavnická, M., Moravec, J., Chemek, M., Kolinko, Y., García-Álvarez, O., ... & Nevoral, J. (2020). Low doses of Bisphenol S affect post-translational modifications of sperm proteins in male mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *18*, 1-10.

Rocha, B. A., Azevedo, L. F., Gallimberti, M., Campiglia, A. D., & Barbosa Jr, F. (2015). High levels of bisphenol A and bisphenol S in Brazilian thermal paper receipts and estimation of daily exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *78*(18), 1181-1188.

Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*, *123*(7), 643-650.

Rohrbasser, L. J., Alsaffar, H., Blair, J., & LeRoith, D. (2016). The hypothalamus–pituitary axis. *Principles of endocrinology and hormone action*, 154-196.

Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 27-34.

Sahu, A., & Verma, R. (2023). Bisphenol S dysregulates thyroid hormone homeostasis; Testicular survival, redox and metabolic status: Ameliorative actions of melatonin. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 104, 104300.

Salimi, M., Esrafili, A., Gholami, M., Jonidi Jafari, A., Rezaei Kalantary, R., Farzadkia, M., ... & Sobhi, H. R. (2017). Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies. *Environmental monitoring and assessment*, *189*, 1-22.

Santangeli, S., Consales, C., Pacchierotti, F., Habibi, H. R., & Carnevali, O. (2019). Transgenerational effects of BPA on female reproduction. *Science of the Total Environment*, 685, 1294-1305.

Santos, C. R., Arcanjo, G. S., Araújo, A. A. D., de Souza Santos, L. V., & Amaral, M. C. S. (2024). Occurrence, environmental risks, and removal of bisphenol A and its analogues by membrane bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, *494*, 153278.

Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, *8*, 1-7.

Savitt, J., Singh, D., Zhang, C., Chen, L. C., Folmer, J., Shokat, K. M., & Wright, W. W. (2012). The in vivo response of stem and other undifferentiated spermatogonia to the reversible inhibition of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in the adult. *Stem cells*, 30(4), 732-740.

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.

Shamhari, A. A., Abd Hamid, Z., Budin, S. B., Shamsudin, N. J., & Taib, I. S. (2021). Bisphenol a and its analogues deteriorate the hormones physiological function of the male reproductive system: A mini-review. *Biomedicines*, 9(11), 1744.

Shi, J., Jiao, Z., Zheng, S., Li, M., Zhang, J., Feng, Y., ... & Shao, B. (2015). Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (Danio rerio), and the impact on offspring. *Chemosphere*, 128, 252-257.

Shi, J., Yang, Y., Zhang, J., Feng, Y., & Shao, B. (2016). Uptake, depuration and bioconcentration of bisphenol AF (BPAF) in whole-body and tissues of zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *132*, 339-344.

Shi, M., Sekulovski, N., MacLean II, J. A., & Hayashi, K. (2017). Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. *Reproductive toxicology*, 73, 280-291.

Silveira, C. R., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Soares, S. L., Anciuti, A. N., Kütter, M. T., & Martínez, P. E. (2019). Effects of Bisphenol A on redox balance in red blood and sperm cells and spermatic quality in zebrafish Danio rerio. *Ecotoxicology*, 28, 913-922.

Skinner, M. K., Tung, P. S., & Fritz, I. B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *The Journal of cell biology*, 100(6), 1941-1947.

Sun, Q., Wang, Y., Li, Y., Ashfaq, M., Dai, L., Xie, X., & Yu, C. P. (2017). Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Environmental Pollution*, *225*, 542-549.

The European Commission. Commission directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending directive. 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. Off. J

Thompson, I. R., & Kaiser, U. B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, *385*(1-2), 28-35.

Tumu, K., Vorst, K., & Curtzwiler, G. (2023). Endocrine modulating chemicals in food packaging: A review of phthalates and bisphenols. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(2), 1337-1359.

U.S. Department of Agriculture. Proposed Bisphenol A ban in food packaging would impact U.S. exports to France. http://gain.fas. usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/

U.S. Food and Drug Administration. Bisphenol A (BPA): *Use in Food Contact Application*.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., ... & Butt, M. A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, 209, 508-516.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Turi, N., Ullah, W., ... & Khan, M. M. (2018). Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action. *Food and chemical toxicology*, 121, 24-36.

Ullah, H., Ambreen, A., Ahsan, N., & Jahan, S. (2017). Bisphenol S induces oxidative stress and DNA damage in rat spermatozoa in vitro and disrupts daily sperm production in vivo. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *99*(5-6), 953-965.

Usman, A., & Ahmad, M. (2016). From BPA to its analogues: Is it a safe journey?. *Chemosphere*, *158*, 131-142.

Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*, *30*(1), 75-95.

Vethaak, D., & Legler, J. (2013). Endocrine disruption in wildlife: Background, effects, and implications. *Endocrine Disrupters: Hazard Testing and Assessment Methods*, 7-58.

Wang, Q., Chen, M., Shan, G., Chen, P., Cui, S., Yi, S., & Zhu, L. (2017). Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. *Science of the Total Environment*, 598, 814-820.

Wehbe, Z., Nasser, S. A., El-Yazbi, A., Nasreddine, S., & Eid, A. H. (2020). Estrogen and bisphenol A in hypertension. *Current hypertension reports*, *22*, 1-10.

Wei, X., Huang, Y., Wong, M. H., Giesy, J. P., & Wong, C. K. (2011). Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China. *Chemosphere*, 85(1), 122-128.

Wei, P., Zhao, F., Zhang, X., Liu, W., Jiang, G., Wang, H., & Ru, S. (2018). Transgenerational thyroid endocrine disruption induced by bisphenol S affects the early development of zebrafish offspring. *Environmental pollution*, 243, 800-808.

Weltzien, F. A., Taranger, G. L., Karlsen, Ø., & Norberg, B. (2002). Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: *Molecular & Integrative Physiology*, 132(3), 567-575.

Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., ... & Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive toxicology*, 24(2), 178-198.

Winz, C., & Suh, N. (2021). Understanding the mechanistic link between bisphenol A and cancer stem cells: a cancer prevention perspective. *Journal of Cancer Prevention*, *26*(1), 18.

Wu, L. H., Zhang, X. M., Wang, F., Gao, C. J., Chen, D., Palumbo, J. R., ... & Zeng, E. Y. (2018). Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of the Total Environment*, *615*, 87-98.

Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., & Wang, Y. (2016). Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget*, 7(9), 10606.

Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P. K., Moon, H. B., ... & Kannan, K. (2015). Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 565-572.

Yan, S., Subramanian, S. B., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Zhang, T. C. (2010). Emerging contaminants of environmental concern: Source, transport, fate, and treatment. *Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management*, *14*(1), 2-20.

Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., & Shao, B. (2014a). Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1328, 26-34.

Yang, Y., Guan, J., Yin, J., Shao, B., & Li, H. (2014b). Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, 112, 481-486.

Yang, X., Liu, Y., Li, J., Chen, M., Peng, D., Liang, Y., ... & Jiang, G. (2016). Exposure to Bisphenol AF disrupts sex hormone levels and vitellogenin expression in zebrafish. *Environmental toxicology*, *31*(3), 285-294.

Yaron, Z., & Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine regulation of fish reproduction. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*, *2*(2), 1500-1508.

Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., & Nishimune, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biology of reproduction*, 69(4), 1303-1307.

Young, G., Kusakabe, M., Nakamura, I., Lokman, P. M., & Goetz, F. W. (2005). Gonadal steroidogenesis in teleost fish. *Molecular aspects of fish and marine biology*, *2*, 155-223.

Yuan, M., Chen, S., Zeng, C., Fan, Y., Ge, W., & Chen, W. (2023). Estrogenic and non-estrogenic effects of bisphenol A and its action mechanism in the zebrafish model: An overview of the past two decades of work. *Environment international*, *176*, 107976.

Zheng, Q., Xiao, H., Shi, H., Wang, T., Sun, L., Tao, W., ... & Wang, D. (2020). Loss of Cyp11c1 causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *Journal of Endocrinology*, 244(3), 487-499.

Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., ... & Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, *153*(9), 4097-4110.

Capítulo 1

Efeitos dos bisfenóis alternativos (BPS e BPAF) na espermatogênese do zebrafish (*Danio rerio*) *ex vivo*: danos à meiose e desregulação transcricional de genes relacionados ao processo espermatogênico e à regulação epigenética.

Resumo

Os contaminantes ambientais de preocupação emergente BPS e BPAF são potenciais desreguladores endócrinos, surgindo como alternativos ao uso do BPA. No entanto, impactam funções reprodutivas em diversos organismos. Neste estudo, tivemos como objetivo investigar os efeitos da exposição direta ao BPS e ao BPAF na espermatogênese do zebrafish (*Danio rerio*), através de cultura de explante testiculares (*ex viv*o). Para tanto, testículos de zebrafish foram expostos à DMSO (0,0001% v/v; controle); 0,5 µg/L; 5 µg/L ou 50 µg/L do BPS ou do BPAF por 7 dias. Nossos resultados mostraram que a exposição ao BPS e ao BPAF foram capazes de afetar a espermatogênese, reduzindo a entrada em meiose (Spc_p), e os cistos pós-meióticos (Spt; para o BPS). Entretanto, o BPS apresenta maior capacidade de afetar os cistos de Spc_p e Spt que o BPAF, que reduziu Spc_p apenas na menor concentração (0,5 µg/L). Além disso, foram avaliados os transcritos de genes envolvidos na função testicular e regulação epigenética. Tanto o BPS como o BPAF foram capazes de modular de forma distinta os genes marcadores de espermatogônias (*pou5f3*, *nanog e dazl*), marcador de prófase da meiose I (*sycp3l*) e esteroidogênese (*cyp19a1a*, *star* e *cyp17a1*). O estímulo de *cyp19a1a*, junto a queda de Spc_p (0,5; 5 e 50 µg/L do BPS; e 0,5 µg/L do BPAF) e Spt (0,5 e 50 µg/L do BPS) apontam para um possível efeito estrogênico do BPS e do BPAF em explante testiculares. No que se refere aos receptores de estrógeno, o BPS não afetou a expressão do *esr1* e *esr2a*. Em conjunto, os resultados sugerem um efeito indireto do BPS por ação antiandrogênica. Em contraposição ao BPS, os resultados mostraram que o BPAF tem capacidade de modular receptores de estrógeno, modulando a expressão do *esr1* e *esr2b* na concentração de 0,5 µg/L. Sugerimos que os que o efeito observado de redução em Spc_p em 0,5 µg/L do BPAF seja decorrente de ação estrogênica direta. Curiosamente, na concentração de 0,5 µg/L do BPS, mais genes de enzimas esteroidogênicas foram afetados, sendo também a única concentração de BPS a estimular o gene marcador de apoptose (*noxa*). De forma semelhante, a menor concentração (0,5 µg/L) do BPAF foi a única dose de BPAF a reduzir a proporção dos cistos meióticos Spc_p, e diminuir os níveis de mRNA do gene marcador de prófase da meiose (*scyp3l)*, dos genes da via esteroidogênica (*star*, *cyp17a1*) e dos receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*). Juntos, os resultados sugerem que a relação dose-resposta para o BPS e o BPAF em explantes testiculares seja não monotônica. Adicionalmente, foi observado que a exposição ao BPS e ao BPAF em explantes testiculares modifica a expressão de genes de enzimas relacionadas à regulação epigenética. Este estudo é pioneiro na avaliação do impacto do BPS e do BPAF na expressão destas enzimas em explantes testiculares. Assim, evidenciamos que o BPAF pode ter um impacto mais significativo na regulação epigenética durante a espermatogênese comparado ao BPS. Em conclusão, mostramos que a potencial desregulação endócrina induzida pelo BPS e o BPAF afeta a transcrição de diversos genes durante a espermatogênese, possivelmente interferindo na regulação epigenética. Apontando que tanto o BPS quanto o BPAF como ¨alternativas seguras ao BPA¨ não são escolhas confiáveis.

1. Introdução

Bisfenóis são plastificantes que constituem uma ampla categoria de substâncias químicas, frequentemente empregadas para aprimorar características mecânicas e eletrônicas de produtos industriais. (Li *et al* 2021a; Rifa & Lavado, 2024; Delfosse *et al* 2012; Yang *et al*., 2019). O primeiro bisfenol desenvolvido, o bisfenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane; BPA) é um dos compostos sintéticos mais abundantes e utilizados no mundo (Wu *et al*., 2018; Thoene *et al*., 2018, Jalal *et al*., 2019). No entanto, existem substanciais evidências indicando que o BPA causa uma variedade de efeitos adversos por ser um agonista parcial dos receptores ERα e ERβ (Delfosse *et al*., 2012, Li *et al*., 2012; Moon *et al*., 2019; Lo Nostro *et al*., 2023). dessa forma, o BPA ocasiona desregulação endócrina por apresentar atividade estrogênica e/ou antiandrogênica, afetando uma ampla gama de funções fisiológicas já descritas previamente (Maffini *et al*., 2006; Rubin, 2011; Harnett *et al*., 2021; Lee *et al*., 2021). Entre elas, podemos citar seus efeitos na reprodução, como alterações nos níveis plasmáticos de testosterona e estradiol (Eladak *et al*., 2015., Lan *et al*., 2017; Ullah *et al* 2018; Ullah *et al*., 2018b, Li *et al*., 2021b) e danos à espermatogênese (Xie *et al*., 2016; Ullah *et al*., 2018b; Gonzalez-Rojo *et al*., 2019; Lombó & Herráez *et al*., 2021).

Em virtude dos efeitos tóxicos do BPA, compostos análogos foram desenvolvidos, como o bisfenol S (4-hydroxyphenyl sulfone; BPS) e bisfenol AF (4,4′ hexafluoroisopropylidene) difenol; BPAF) comumente usados como BPA-substitutos (Yang *et al*., 2019). O BPS é um produto químico frequentemente utilizado em colas epóxi, enlatados, papéis térmicos de recibos e embalagens de alimentos (Ji *et al*., 2013; Tumu *et al*., 2023). O BPS é mais estável à altas temperaturas e luminosidade em relação ao BPA, sendo capaz de substituir o BPA em algumas aplicações industriais (Liao *et al*., 2012, revisado por Fang *et al*., 2020; Naderi *et al.,* 2020; Loganathan *et al*., 2023;). O BPAF é um difenol fluorado principalmente utilizado como agente "cross-linking" na produção de fluoroelastômeros e fluoropolímeros, sendo utilizado na produção industrial pela sua resistência a condições de elevada temperatura e a produtos químicos (revisado por Feng *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2013; Lo Nostro *et al*., 2023). Além disso, o BPS e o BPAF possuem maior resistência a biodegradação em comparação ao BPA, e por isso, podem ser mais persistentes na natureza, originando problemas ecológicos (Yang *et al*., 2019; Frankowski *et al*., 2020).

Devido à similaridade estrutural com BPA, tanto o BPS quanto o BPAF atuam como compostos estrogênicos/ e ou antiandrogênicos (Chen *et al*., 2016; Hercog *et al*., 2019; Braver-

Sewradj *et al*., 2020; Lin *et al*., 2021) e afetam a produção de estrógenos e andrógenos como reportados em vários organismos modelo (Feng *et al*., 2012; Ji *et al*., 2013., Eladak *et al*., 2015; Roelofs *et al*., 2015; Lee *et al*., 2021; Shamhari *et al*., 2021; Park *et al*., 2022). Além disso, o BPS e o BPAF prejudicam a espermatogênese através de seus efeitos nas espermatogônias, células de Leydig e Sertoli como demonstrado em mamíferos de forma *in vivo* e *in vitro* (Liang *et al*., 2017; Ullah *et al*., 2018; Wu *et al* 2019; Dai *et al*., 2021; Yin *et al*., 2023; Xue *et al*., 2023). Contudo, apesar dos estudos demonstrando os efeitos do BPS e do BPAF no sistema endócrino e sistema reprodutivo em zebrafish (Ji *et al*., 2013; Naderi *et al*., 2014; Shi *et al*., 2015; Qiu *et al* 2021; Meng *et al* 2023), há carência de estudos avaliando seus mecanismos moleculares e celulares na espermatogênese.

Adicionalmente, os efeitos de poluentes ambientais na reprodução têm sido de grande preocupação aos pesquisadores. A maiorias dos poluentes ambientais não alteram diretamente a sequência do DNA ou promovem mutações gênicas diretamente, mas podem aumentar o risco de doenças transgeracionais por meio de mecanismos epigenéticos (Jirtle & Skinner, 2007; Hanson & Skinner, 2016; Hao *et al*., 2022). As alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, modificações nas histonas e a produção de RNAs não codificantes (ncRNAs), exercem uma função fundamental na toxicidade reprodutiva transgeracional induzida por agentes poluentes ambientais (McBirney *et al*., 2017; Herráez *et al*., 2017; Hao *et al*., 2022).

Considerando o contexto do BPS e do BPAF como contaminantes ambientais de preocupação emergente e como desreguladores endócrinos, este estudo teve como objetivo avaliar as consequências da exposição direta do BPS e do BPAF na espermatogênese de zebrafish (*Danio rerio*) através de culturas organotípicas de testículos. Para avaliar esses efeitos, foram realizadas análises histomorfométricas para descrever a condição dos cistos espermatogênicos, além de análises de expressão gênica para evidenciar os impactos desses contaminantes nos genes marcadores da linhagem germinativa, esteroidogênese, receptores de estrógenos e enzimas de regulação epigenética. Desta forma, pela primeira vez, foram descritos os efeitos da exposição direta ao BPS e ao BPAF em explantes testiculares de peixe, trazendo potenciais avanços para o entendimento da ação desses bisfenóis na reprodução e biologia dos testículos.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Machos adultos de zebrafish (*Danio rerio*) foram criados e mantidos nas instalações de aquários localizadas no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Botucatu, Brasil). Os peixes foram alojados em tanques de 6 litros em sistema de recirculação de água sob temperatura constante (28 ◦C) e fotoperíodo controlado (14 h de luz e 10h escuro). Parâmetros como salinidade, pH, oxigênio dissolvido e amônia foram monitorados diariamente. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com uma dieta de ração seca comercial (Zeigler®). Todas as práticas de manejo e experimentação seguiram as diretrizes estabelecidas pela legislação brasileira regulamentado pelo Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2023) e Princípios Éticos em Pesquisa Animal da Instituição (Protocolo 6605200721-CEUA).

2.2 Químicos

O bisfenol S (4 hydroxyphenyl sulfone; BPS, 99,7% de pureza) e bisfenol AF (4,4′ hexafluoroisopropylidene) difenol; BPAF, 99% de pureza) foram adquiridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) (conforme instrução do fabricante).

2.3 Culturas organotípicas (7 dias)

Para investigar os efeitos do BPS e o BPAF na espermatogênese, testículos de zebrafish foram dissecados e cultivados utilizando o método de cultura de testículos previamente padronizado para essa espécie (Leal *et al*., 2009a). Os zebrafish (n = 96) foram eutanasiados por imersão em solução de Benzocaína a 0,1%, e seus testículos foram dissecados e removidos em condições estéreis. Para cada análise (expressão gênica e histomorfometria), utilizamos 8 testículos em duas réplicas experimentais, totalizando 16 machos para cada concentração do BPS ou do BPAF e seus respectivos controles (em meio de cultura L-15 com DMSO 0,0001% v/v). Cada testículo de zebrafish foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (0,25 cm^2, 25µm de espessura e 0,22 µm de porosidade) no topo de um cilindro de agarose (1,5% p/v, solução de Ringer, pH 7,4) e colocado em uma placa de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura (L-15). Para avaliar os efeitos do BPS e do BPAF, um testículo foi incubado em presença de 0,5 µg/L; 5 µg/L ou 50 µg/L do BPS ou do BPAF, enquanto seu contralateral foi incubado em meio de cultura (L-15) com DMSO (0,0001% v/v) por 7 dias. Neste método, a influência

da variação interindividual é minimizada através da incubação em paralelo dos dois testículos de cada peixe, de forma que um testículo atua como controle em relação ao outro (De Waal *et al*., 2009). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias para todas as incubações. Após 7 dias, os testículos foram coletados para análise de expressão gênica (item 2.4) e histomorfométrica (item 2.5).

2.4 Análises histomorfométricas

Testículos de zebrafish (n = 8 para cada condição experimental) foram fixados *overnight* em Karnovisky (Glutaraldeído 4% paraformaldaído 8% em tampão fosfato pH 7.2) desidratados, embebidos em Technovit (7100-Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha), seccionados em cortes de 3µm de espessura (não seriados), e corados com azul de toluidina 0,1% para quantificação dos diferentes tipos de cistos de células germinativas, utilizando à objetiva de 100x do microscópio de luz de alta resolução (Leica DM600 BD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Imagens microscópicas de 100 campos histológicos por testículo foram randomicamente selecionados para quantificação dos cistos de células germinativas: espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócito primário em paquíteno (Spc_p) e espermátides (Spt). Utilizando critérios já estabelecidos na literatura para células germinativas de zebrafish, como tamanho do núcleo, número de células germinativas por cisto e grau de compactação da cromatina (Leal *et al*., 2009b; Schulz *et al*., 2010; Morais *et al*., 2013).

2.5 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O RNA total (n = 8 para cada condição experimental) foi extraído usando o reagente Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, Unites States) de acordo com instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado como descrito previamente (Nóbrega *et al*., 2010). Reações de qPCR foram conduzidas utilizando 10 µL de 2x SYBR-Green Universal Master Mix, 2 µL de primer forward (1125 nM), 2 µL de primer reverse (1125 nM), 1 µL de água DEPC, e 5 µL of cDNA. Os níveis de mRNA dos genes expressos nas diferentes gerações espermatogoniais, como *pou5f3* (POU domain, class 5, transcription factor 3), *nanog* (nanog homeobox) e *dazl* (deleted in azoospermia-like); e genes expressos em espermatócito primário em paquíteno, como *sycp3l* (synaptonemal complex protein 3), foram avaliados. Além disso, também foram avaliadas a

expressão gênica de enzimas da via esteroidogenica, *cyp19a1a* (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a), *star* (steroidogenic acute regulatory), *cyp17a1a* (17α-hydroxylase/17,20 lyase/17,20 desmolase); receptores de estrógeno, *esr1*, *esr2a*; marcador de apoptose, *noxa* (*pmaip1*, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), e genes de regulação epigenética, *dnmt5* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase beta, duplicate b.3), *tet1* (tet methylcytosine dioxygenase 1), *ezh2* (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit), *kdm6b* (lysine (K)-specific demethylase 6B), *kat6a* (K(lysine) acetyltransferase 6A) e *hdac4* (histone deacetylase 4). As expressões dos alvos de mRNA (CTs) foram normalizadas utilizando o gene β-actina como referência, considerado os níveis de expressão desse gene de referência estável entre os grupos experimentais (García-Lopez *et al*.,2010; Costa *et al*., 2024). Os resultados foram expressos como valores relativos ao grupo controle (como fold induction), usando o método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. Os primers foram desenhados de acordo com as sequências genéticas do zebrafish disponíveis no GenBank (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e estão indicados na Tabela 01.

Tabela 1

Target	**Primers sequence (5´- 3´)**		**Access (NCBI)**
β-actin	AGACATCAGGGAGTGATGGT	Fw	BC045846
	CAATACCGTGTCAATGGGG	Rv	
pou5f3	GAGAGATGTAGTGCGTGTAT	Fw	BC049295.1
	GCTCGTAATACTGTGCTTCA	Rv	
nanog	TGTCCTACAACAAGACTGAGCC	Fw	BC162315.1
	CAGGAATCTGGCGTGTGGG	Rv	
dazl	AGTGCAGACTTTGCTAACCCTTATGTA	Fw	BC076423.1
	GTCCACTGCTCCAAGTTGCTCT	Rv	
star	CCTGGAATGCCTGAGCAGAA	FW	AF220435
	ATCTGCACTTGGTCGCATGAC	Rv	
cyp17a1	GGGAGGCCACGGACTGTTA	FW	NM_212806.3
	CCATGTGGAACTGTAGTCAGCAA	Rv	
sycp3l	AGAAGCTGACCCAAGATCATTCC	FW	BC115343
	AGCTTCAGTTGCTGGCGAAA	Rv	
esr1	GGTCCAGTGTGGTGTCCTCT	FW	NM_152959.1
	AGAAAGCTTTGCATCCCTCA	Rv	
esr2a	GCCGACTCCGAAAGTGCTAT	FW	NM_180966.2
	AGTGATATGCGCACCACCTC	Rv	
noxa	ATGGCGAAGAAAGAGCAAAC	FW	NM_001045474.3

	CGCTTCCCCTCCATTTGTAT	Rv	
dnmt5	TCATTGACTTGGGGGAAGAG	FW	AB196916.1
	GCTGCTGCTGCACTTATCAT	Rv	
tet1	GCAACCACTCCCATCCTTCGAC	FW	XM_021472702.1
	TGTTAGCGACTGACGGGTAGGGAC	Rv	
ezh2	CAGACTCATCGGCACAAAGA	FW	NM_001077279.1
	TGACACAAGGGCAAGAACTG	Rv	
kdm6b	GCCGTCAACGAAGTCCTATC	FW	NM_001030178.2
	CTCCTTGTGCCTCTTCTTGG	Rv	
kat6a	CACCAGAGAAGCCACTGTCA	FW	NM_001123312.4
	TAATTACCCCGTCCCCTTTC	Rv	
hdac4	TGTGTTTCTGCTTTGCTTGG	FW	NM_001123312.4
	GTGACCGTCTCTGCCTCTTC	Rv	

2.6 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido de Teste de variância e homogeneidade de Bartlett. Diferenças significativas foram identificadas usando o teste t de Student pareado ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média ± SEM (erro padrão da média). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (versão 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA, http://www.graphpad.com).

3. Resultados

3.1 Análise histomorfométrica dos efeitos do BPS e do BPAF na espermatogênese do zebrafish

Todos os tratamentos com o BPS (0,5; 5 e 50 µg/L) apresentaram queda significativa da proporção de área ocupada por SPC_p (Fig 1). Além disso, nenhuma concentração do BPS afetou a proporção de área ocupada pelos cistos de espermatogônias (A_{und}, A_{diff} e SpgB). Por outro lado, a área ocupada pelos cistos de Spt foram reduzidos nas concentrações 0,5 e 50 µg/L do BPS (Fig 1A e 1C).

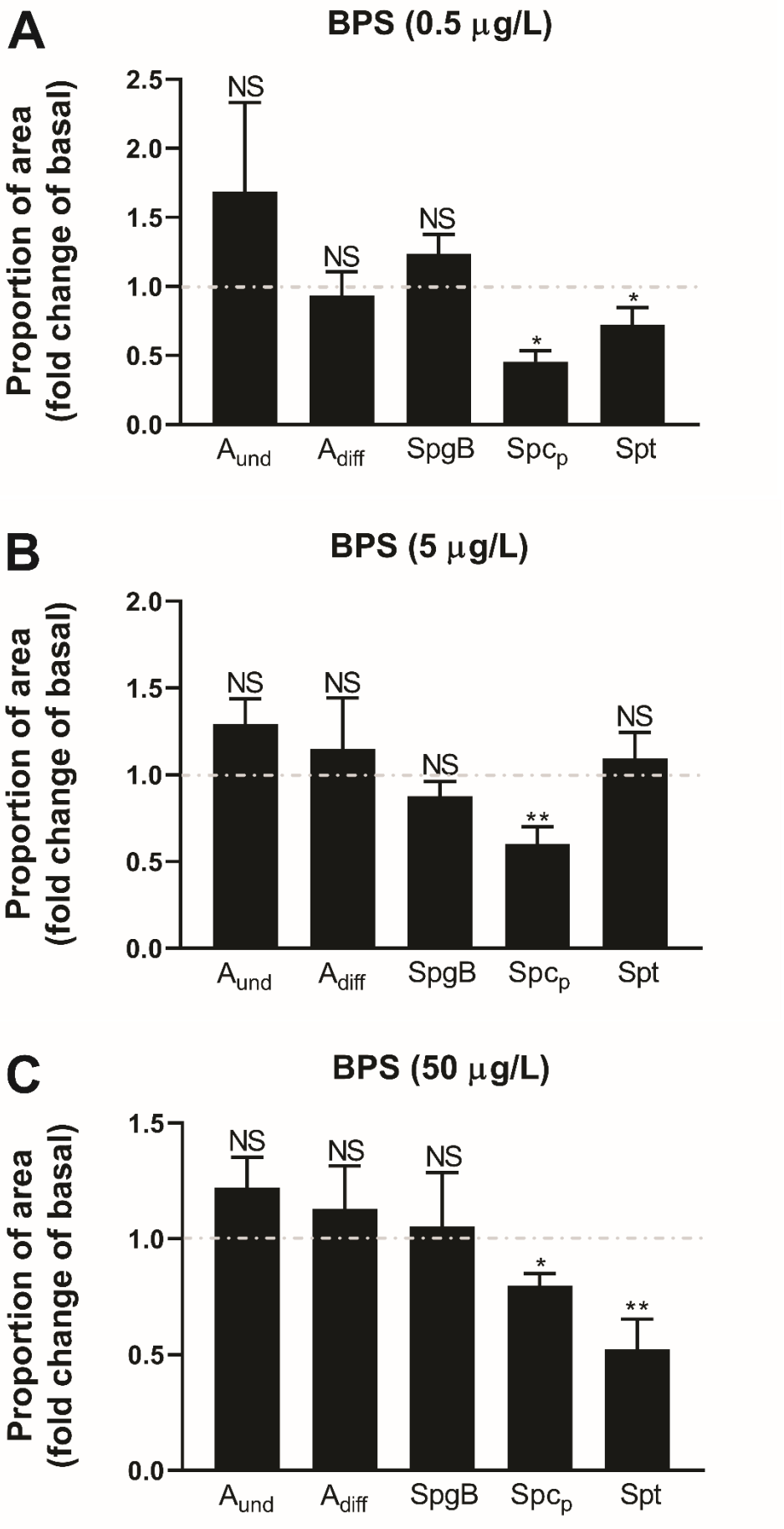

A
BPS (0.5 μg/L)
Proportion of area (fold change of basal)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
NS
*
*
A_und
A_diff
SpgB
Spc_p
Spt
B
BPS (5 μg/L)
Proportion of area (fold change of basal)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
NS
**
NS
A_und
A_diff
SpgB
Spc_p
Spt
C
BPS (50 μg/L)
Proportion of area (fold change of basal)
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
NS
*
**
A_und
A_diff
SpgB
Spc_p
Spt

Fig. 1. Análises histomorfométricas dos testículos de zebrafish cultivados após exposição ao BPS. Proporção de área de superfície ocupada por cistos espermatogênicos após 7 dias de incubação na presença de DMSO (0,0001% v/v) (basal) ou tratados com BPS em diferentes concentrações. (A) 0,5 µg/L de BPS. (B) 5 µg/L de BPS. (C) 50 µg/L de BPS. Dados representados como fold change do grupo basal. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=8). (*) e (**) representam diferenças significativas observadas entre os diferentes grupos com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; (NS) sem diferença significativa. Cistos de espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócito primário em paquíteno (Spc_p) e espermátides (Spt).

Quanto ao tratamento com o BPAF, apenas a concentração de 0,5 µg/L foi capaz de reduzir a área ocupada pelos cistos de Spc_p (Fig 2A). A proporção da área ocupada pelo cistos de espermatogônias não sofreram alteração, excetuando-se A_{diff} na concentração de 50 µg/L (Fig 2C). No mais, a área dos cistos de Spt não foram alterados (Fig 2).

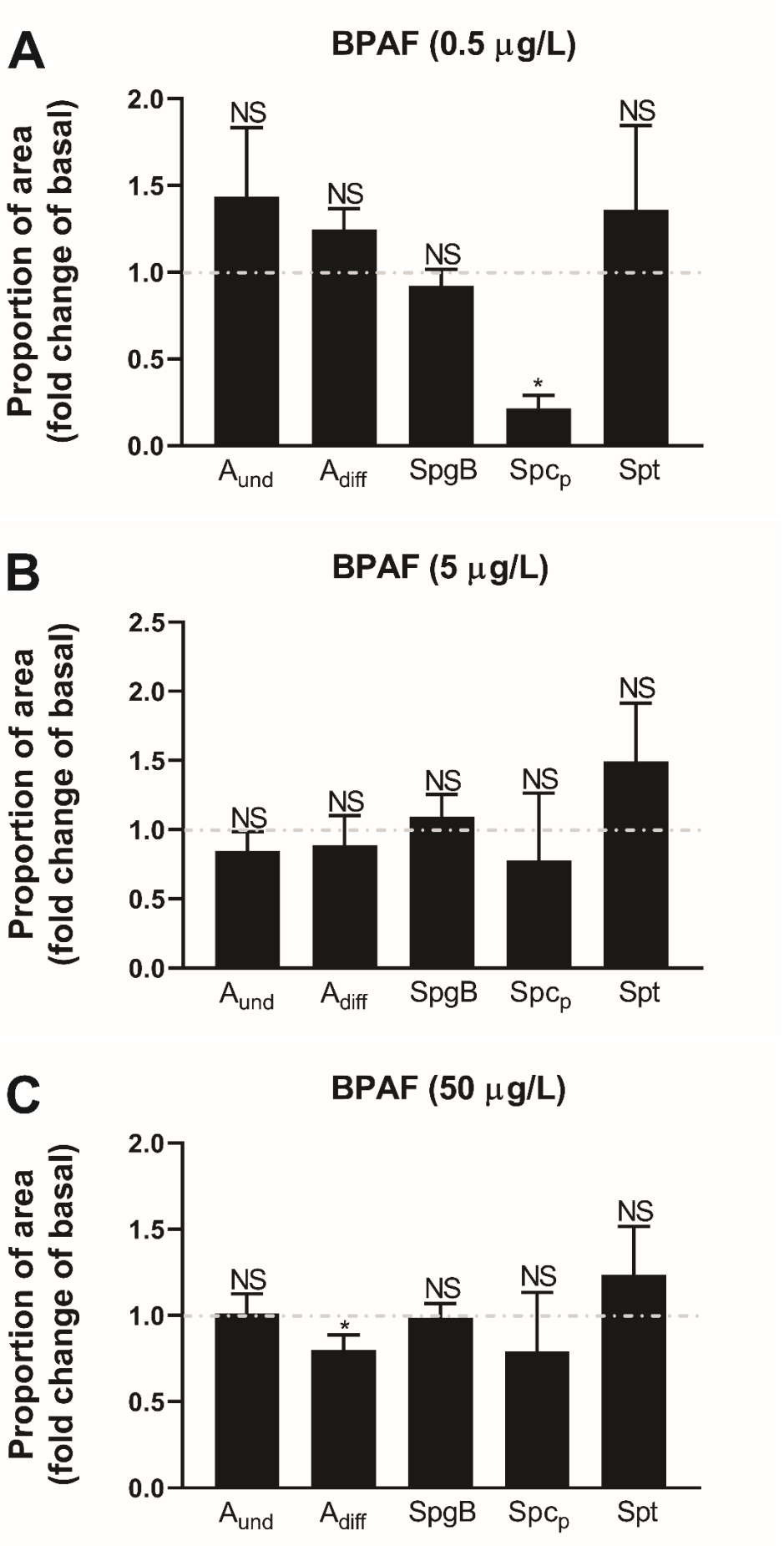

A
BPAF (0.5 μg/L)
Proportion of area (fold change of basal)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
NS
*
NS
A_und
A_diff
SpgB
Spc_p
Spt
B
BPAF (5 μg/L)
Proportion of area (fold change of basal)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
NS
NS
NS
A_und
A_diff
SpgB
Spc_p
Spt
C
BPAF (50 μg/L)
Proportion of area (fold change of basal)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
*
NS
NS
NS
A_und
A_diff
SpgB
Spc_p
Spt

Fig. 2. Análises histomorfométricas dos testículos de zebrafish cultivados após exposição ao BPAF. Proporção de área de superfície ocupada por cistos espermatogênicos após 7 dias de incubação na presença de DMSO (0,0001% v/v) (basal) ou tratados com BPS em diferentes concentrações. (A) 0,5 µg/L de BPAF. (B) 5 µg/L de BPAF. (C) 50 µg/L de BPAF. Dados representados como fold change do grupo basal. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=8). (*) representa diferenças significativas observadas entre os diferentes grupos com $p < 0,05$; (NS) sem diferença significativa. Cistos de espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócito primário em paquíteno (Spc_p) e espermátides (Spt).

3.2 Análise de expressão gênica dos efeitos do BPS e do BPAF na espermatogênese do zebrafish

Os contaminantes ambientais BPS e BPAF foram capazes de afetar a expressão gênica dos testículos de zebrafish após os 7 dias de exposição em relação aos seus respectivos grupos controle (Fig 3 e Fig 4). O tratamento com o BPS na concentração de 50 µg/L foi capaz de reduzir significativamente *sycp3l* - marcador de prófase da meiose – em relação à condição basal (Fig 3C). Os genes marcadores de espermatogônias (*pou5f3*, *nanog* e *dazl*) tiveram expressões alteradas na concentração de 5 µg/L do BPS, apresentando redução de expressão. (Fig 3B). A expressão dos genes das enzimas esteroidogênicas (*cyp19a1a*, *star* e *cyp17a1*) mostra-se elevada na presença do BPS (0,5 µg/L) (Fig 3A). Da mesma forma, *cyp19a1a* teve sua expressão estimulada na concentração de BPS (50 µg/L) (Fig 3C). Nenhuma concentração do BPS foi capaz de alterar a expressão dos receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*) (Fig 3). O gene *noxa* – marcador de apoptose – apresentou aumento significativo na concentração de 0,5 µg/L (Fig 3A). Por fim, as exposições ao BPS foram capazes de afetar a expressão de enzimas de regulação epigenética, no entanto, modulando apenas o gene *hdac4*, que sofreu alteração em todas as concentrações avaliadas; redução de expressão com 0,5 µg/L do BPS (Fig 3A) e estímulo em 5 µg/L (Fig 3B) e 50 µg/L do BPS (Fig 3C).

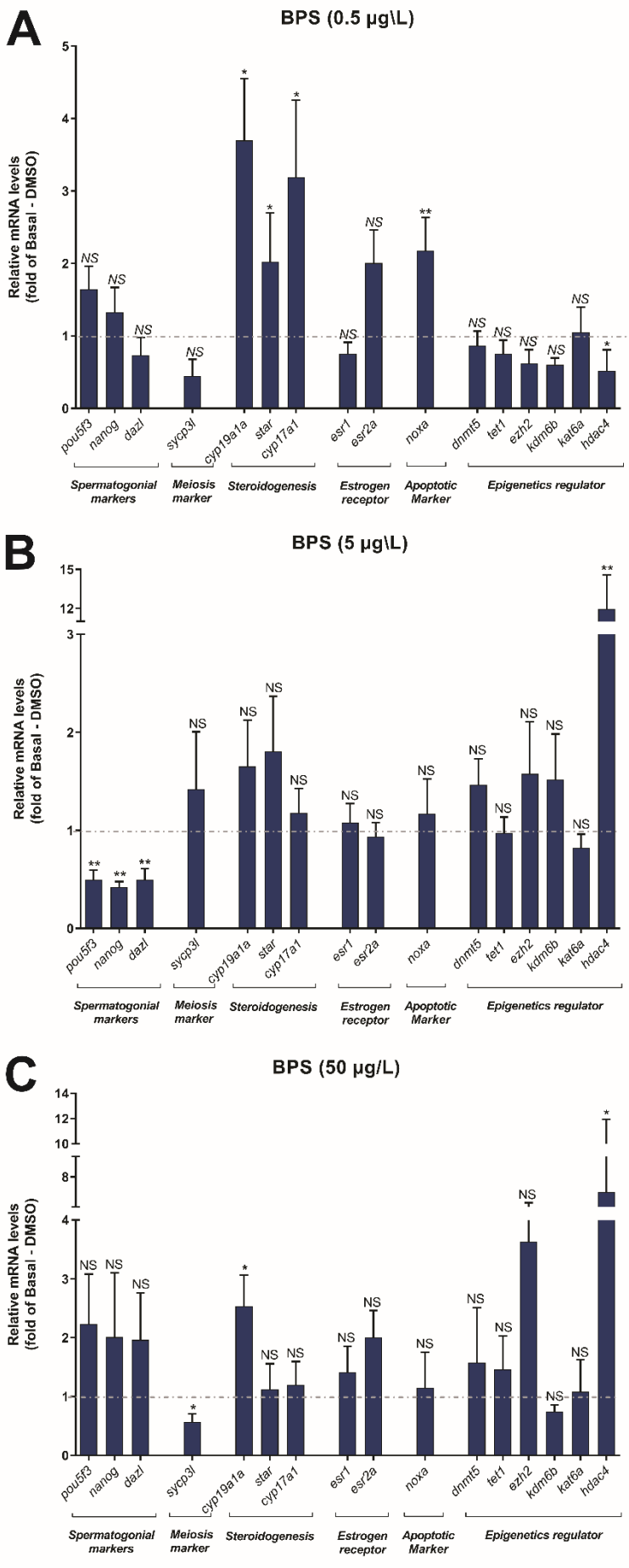

A
BPS (0.5 µg\L)
Relative mRNA levels (fold of Basal - DMSO)
pou5f3
nanog
dazl
sycp3l
cyp19a1a
star
cyp17a1
esr1
esr2a
noxa
dnmt5
tet1
ezh2
kdm6b
kat6a
hdac4
Spermatogonial markers
Meiosis marker
Steroidogenesis
Estrogen receptor
Apoptotic Marker
Epigenetics regulator
B
BPS (5 µg\L)
C
BPS (50 µg/L)

Fig. 3. Análise de expressão gênica dos testículos de zebrafish cultivados após exposição ao BPS. Expressão relativa dos genes marcadores de espermatogônias (*pou5f3*, *nanog*, *dazl*), prófase da meiose (*scyp3l*), enzimas de esteroidogênese (*cyp19a1a*, *star*, *cyp17a1*), receptores de estrógeno (*esr1*, *esr2a*), marcador de apoptose (*noxa*), e genes de regulação epigenética (*dnmt5*, *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4*) em culturas de testículos de zebrafish, após 7 dias de incubação na presença de DMSO (0,0001% v/v) (basal) ou tratados com BPS em diferentes concentrações. (A) 0,5 µg/L de BPS. (B) 5 µg/L de BPS. (C) 50 µg/L de BPS. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β- actina) e expressos relativos ao grupo basal (DMSO). Os dados estão apresentados com a média ± erro padrão (n=8) e como fold induction do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas em L-15 e DMSO 0,0001% *v/v*) representado pela linha tracejada. (*) representa diferença significativa ($p<0,05$), (**) representa diferença significativa ($p<0,01$), (NS) sem diferença significativa.

O tratamento com o BPAF foi capaz de modular significativamente a expressão de *sycp3l*, em relação à condição basal em todas as concentrações avaliadas, apresentando redução de seus níveis na exposição com 0,5 µg/L do BPAF (Fig 4A), e aumento nas concentrações maiores (Fig 4B, 4C). Os genes marcadores de espermatogônias tiveram expressões alteradas nas concentrações de 5 µg/L (redução do *nanog*) (Fig 4B) e 50 µg/L (aumento do *pou5f3* e *dazl*) (Fig 4C). O tratamento com o BPAF foi capaz de modular a expressão dos genes das enzimas de esteroidogênese em todas as concentrações (Fig 4). A uma concentração de 0,5 µg/L, houve queda na expressão do *star* e *cyp17a1* (Fig 4A), enquanto em 5 µg/L, ocorreu estímulo da expressão do *star* (Fig 4B). Já em 50 µg/L, observou-se um aumento na expressão do *cyp19a1a*, *star* e *cyp17a1* (Fig 4C).

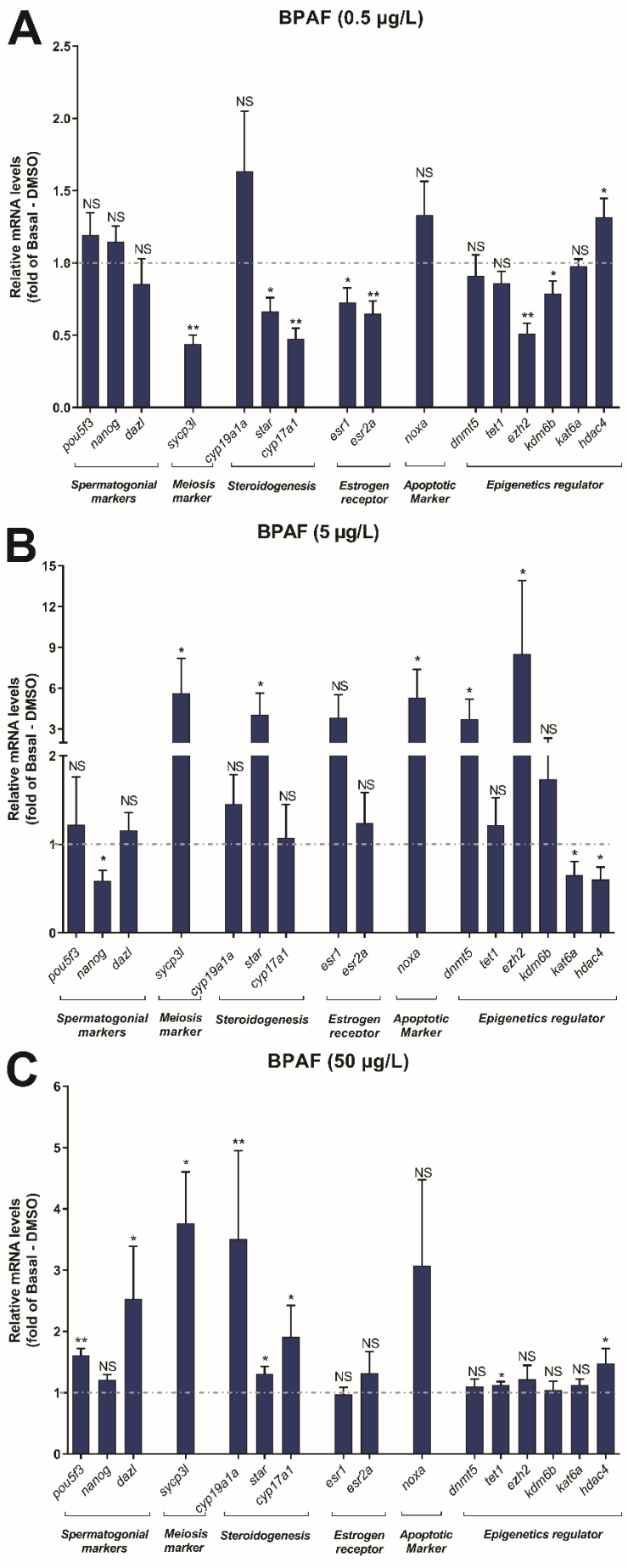

A
BPAF (0.5 µg/L)
Relative mRNA levels (fold of Basal - DMSO)
pou5f3
nanog
dazl
sycp3l
cyp19a1a
star
cyp17a1
esr1
esr2a
noxa
dnmt5
tet1
ezh2
kdm6b
kat6a
hdac4
Spermatogonial markers
Meiosis marker
Steroidogenesis
Estrogen receptor
Apoptotic Marker
Epigenetics regulator
B
BPAF (5 µg/L)
C
BPAF (50 µg/L)

Fig. 4. Análise de expressão gênica dos testículos de zebrafish cultivados após exposição ao BPAF. Expressão relativa dos genes marcadores de espermatogônias (*pou5f3*, *nanog*, *dazl*), prófase da meiose (*scyp3l*), enzimas de esteroidogênese (*cyp19a1a*, *star*, *cyp17a1*), receptores de estrógeno (*esr1*, *esr2a*), marcador de apoptose (*noxa*), e genes de regulação epigenética (*dnmt5*, *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4*) em culturas de testículos de zebrafish, após 7 dias de incubação na presença de DMSO (0,0001% v/v*)* (basal) ou tratados com BPS em diferentes concentrações. (A) 0,5 µg/L de BPAF. (B) 5 µg/L de BPAF. (C) 50 µg/L de BPAF. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β- actina) e expressos relativos ao grupo basal (DMSO). Os dados estão apresentados com a média ± erro padrão (n=8) e como fold induction do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas em L-15 e DMSO 0,0001% *v/v*) representado pela linha tracejada. (*) representa diferença significativa ($p<0,05$), (**) representa diferença significativa ($p<0,01$), (NS) sem diferença significativa.

Ao contrário do BPS, o BPAF foi capaz de modificar a expressão dos receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*), promovendo redução da expressão gênica na concentração de 0,5 ug/L (Fig 4A). Os níveis relativos de mRNA do gene *noxa* apresentaram aumento significativo na concentração de 5 µg/L (Fig 4B). Por último, o tratamento com o BPAF foi capaz de afetar a expressão gênica de todas as enzimas de regulação epigenética avaliadas (*dmnt5*, *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4*) que apresentaram respostas variáveis de acordo com as concentrações do BPAF utilizadas (Fig 4). A exposição com 0,5 µg/L do BPAF reduziu a expressão das enzimas responsáveis por metilação (*ezh2*) e desmetilação (*kdm6b*) de histonas (Fig 4A). A exposição com 5 µg/L do BPAF aumentou os níveis relativos de mRNA das enzimas responsáveis por metilação do DNA (*dnmt5*) e metilação das histonas (*ezh2*), além disso, reprimiu a expressão das enzimas responsáveis por acetilação (*kat6a*) e desacetilação (*hdac4*) das histonas (Fig 4B). A exposição com 50 µg/L do BPAF foi a única condição capaz de afetar a expressão da enzima Tet1 - responsável pelo processo de desmetilação do DNA – diminuindo sua expressão (Fig 4C). Vale destacar que todas as concentrações do BPS e do BPAF avaliadas foram capazes de modular a expressão da enzima *hdac4*.

4. Discussão

Os alternativos ao BPA - BPS e o BPAF - são desreguladores endócrinos de preocupação emergente capazes de afetar funções reprodutivas como já reportados em diversos organismos modelo (Shi *et al*., 2015; Ullah *et al*., 2018; Wu *et al*., 2019; Cai *et al*., 2020; Dai *et al*., 2021; Meng *et al*., 2023; Yin *et al*., 2023). No entanto, a literatura é incipiente no tocante aos efeitos desses contaminantes na espermatogênese de peixes, particularmente do ponto de vista celular

e molecular. Ademais, não foram encontrados trabalhos que tenham realizado ensaios *ex vivo* capazes de avaliar os efeitos diretos destes análogos ao BPA na espermatogênese de peixes. Aqui, avaliamos os efeitos do BPS e o BPAF na espermatogênese do zebrafish, através de cultura de testículos, um método bem validado para avaliar os efeitos da exposição direta de substâncias diversas no nicho espermatogonial, e consequentemente, na espermatogênese (Leal *et al*., 2009a; Morais *et al*., 2013; Nóbrega *et al*., 2015; Crespo *et al*., 2016; Rodrigues *et al*., 2022; Costa *et al*., 2024). Nossos resultados mostraram que o BPS e o BPAF são capazes de afetar, *ex vivo*, a espermatogênese do zebrafish. As concentrações de 0,5; 5 e 50 µg/L do BPS reduziram a área ocupada pelos cistos de espermatócitos em paquíteno após 7 dias de exposição em relação aos seus respectivos grupos basais. Os cistos de espermatócito em paquíteno (Spc_p) foram escolhidos como modo de quantificar a entrada em meiose I, este estágio em específico foi selecionado por apresentar evidentes características morfológicas de fácil visualização em microscópio; os espermatócitos em paquíteno são o maior tipo celular entre os espermatócitos (cistos em meiose), seu núcleo é mais denso e contém cromossomos como linhas em negrito da periferia até a parte central do núcleo (fibras do complexo sinaptonêmico) (Leal *et al*., 2009b). O efeito do BPS nas concentrações de 0,5; 5 e 50 µg/L em Spc_p evidência a capacidade do BPS em reduzir a entrada em meiose I. Corroborando este achado histomorfométrico, o BPS à 50 µg/L reduziu significativamente os níveis relativos de *sycp3l*; utilizado como gene marcador de prófase da meiose I por codificar um componente do complexo sinaptonêmico (Saito *et al* 2011; Tovo-Neto *et al*., 2020; Dai *et al*., 2021). Da mesma forma, o BPS nas concentrações de 0,5 e 50 µg/L também foi capaz de reduzir a proporção de área dos cistos pós-meióticos (Spt). Igualmente, Ullah e colaboradores (2018b) observaram redução de espermatócitos e espermátides em testículos de ratos adultos após ingestão de 50 µg/L do BPS diluídos em água por 48 semanas, evidenciando que o BPS pode afetar a meiose em diferentes organismos.

De forma menos expressiva, o BPAF reduziu a proporção de área dos Spc_p apenas na menor concentração (0,5 µg/L) em relação ao grupo basal, redução que também foi acompanhada pela queda acentuada da expressão do *sycp3l*. No entanto, a histomorfometria das demais concentrações do BPAF (5 e 50 µg/L), apesar de indicarem tendencia de queda dos Spc_p (não significativo), apresentaram aumento da expressão de *sycp3l*. Ye e colaboradores (2023) encontraram que *sycp3l* é mais expressa nos estágios de leptóteno e zigóteno e pouco expressa em paquíteno, evidenciando que *sycp3l*, apesar de ser marcador de prófase da meiose I, não é um marcador ideal para correlação direta com Spc_p. Por fim, os resultados da histomorfometria revelam que o BPAF, tal como observado para o BPS, também é capaz de

afetar a meiose, reduzindo a proporção de $Spc_{p.}$ Porém, os resultados indicam que para o BPAF está capacidade não é diretamente proporcional a concentração utilizada, visto que as duas maiores concentrações (5 e 50 µg/L) do BPAF não afetaram significativamente Spc_p, sendo, portanto, uma resposta não monotônica.

A fim de investigar os possíveis efeitos do BPS e do BPAF na geração espermatogonial, foi quantificada a expressão dos genes marcadores de espermatogônias: *pou5f3*, *nanog e dazl* (Tovo-Neto *et al* 2020; Costa *et al*., 2024). As concentrações 0,5 e 50 µg/L do BPS e 0,5 µg/L do BPAF não causaram qualquer alteração em genes marcadores espermatogônias e, alinhado a isto, não apresentaram modificação na área ocupada pelos cistos espermatogoniais avaliados (A_{und}, A_{diff} e SpgB). No entanto, não houve correspondência entre a histomorfometria dos cistos espermatogoniais avaliados e seus respectivos genes marcadores nas concentrações de 5 µg/L do BPS e 5 e 50 µg/L do BPAF. Em especial 5 µg/L do BPS, onde as quedas acentuadas nos 3 marcadores espermatogônias (*pou5f3*, *nanog* e *dazl*) não foi acompanhada por modificação da quantidade dos cistos espermatogônias.

Assis e colaboradores (2018), utilizando 17-B estradiol (E2) em machos adultos de zebrafish, não encontraram modulação no gene marcador de espermatogonia avaliado, *dazl*, apesar da resposta celular ter sido queda de SpgB. Da mesma forma, Costa e colaboradores (2024) observaram em explantes testiculares cultivados por 7 dias, queda de *pou5f3* não refletindo em queda de A_{und}. Além disso, encontraram estímulo de *dazl* não alinhado ao dado histomorfométrico (houve queda de cistos de A_{diff} e SpgB). Ou seja, assim como no presente trabalho, é possível que os níveis de mRNA dos genes marcadores espermatogoniais não reflitam simplesmente a histomorfometria, mas também respondam a condições não identificadas relacionadas aos tratamentos (Assis *et al* 2018). Além disso, a variação dentro das espermatogônias dos tipos A_{und} e A_{diff} pode resultar em subpopulações de espermatogônias expressando *pou5f3* e *dazl* diferencialmente (Costa *et al*., 2024). Apesar de não termos encontrado correspondência na histomorfometria em todas as concentrações, o BPS e o BPAF foram capazes de modular genes marcadores de espermatogônias. Até onde sabemos, este foi o primeiro trabalho a avaliar o efeito do BPS e do BPAF na expressão de genes marcadores espermatogoniais em testículos de peixes adultos.

A esteroidogênese é um processo indispensável para a manutenção e progressão da espermatogênese (Sharma & Agarwal., 2011). No presente trabalho, vimos que tanto o BPS como o BPAF foram capazes de modular a expressão de enzimas esteroidogênicas. A enzima

Cyp19a1 está envolvida na síntese de estrógeno através da conversão de andrógenos (Tong *et al*., 2003; Hinfray *et al*., 2013). Estudos com diferentes concentrações de E2 e tempos de exposição, mostraram que o E2 possui efeito inibitório da espermatogênese em zebrafish, estando envolvido na redução dos cistos em meiose (De Waal *et al*., 2009; Hinfray *et al*., 2013, Assis *et al*., 2018). Aqui, encontramos nas concentrações do BPS à 0,5 µg/L e 50 µg/L, concomitantemente as reduções de Spc_p e Spt, aumento do *cyp19a1a*, indicando a formação de um ambiente de bloqueio a entrada da meiose. Da mesma forma, 50 µg/L do BPAF também foi capaz de estimular significativamente a expressão de *cyp19a1a*, apesar de não ocorrer queda significativa de Spc_p.

cyp19a1a é considerado um gene predominantemente mais expresso em fêmeas de zebrafish (Rodriguez-Marí *et al*., 2010; Tzung *et al*., 2015). Nossos resultados mostraram que todas as concentrações do BPS e do BPAF estimularam a expressão de *cyp19a1a,* ou apresentaram tendência de aumento. O estímulo de *cyp19a1a*, junto a queda de Spc_p (0,5; 5 e 50 µg/L do BPS; e 0,5 µg/L do BPAF) e Spt (0,5 e 50 µg/L do BPS) apontam para um possível efeito estrogênico do BPS e do BPAF em explante testiculares. Estudos *in sílico* e *in vitro*, demonstraram que o BPAF é potencialmente mais estrogênico que o BPA, por apresentar maior afinidade pelos receptores de estrógeno *ERα* e *ERβ* (Matsushima *et al* 2010; Mu *et al* 2018). Além disso, o BPAF apresenta a maior atividade estrogênica em embriões de zebrafish em comparação ao BPA e o BPS (Mu *et al*., 2018).

A enzima Star é o principal fator regulando a atividade esteroidogênica (Yu *et al* 2014; Bhat *et al*., 2021). Por sua vez, dentre outras funções, a enzima Cyp17a1 é importante para a produção de andrógenos (Porubek *et al*., 2013; Bacila *et al*., 2021). De modo geral, encontramos correlação diretamente proporcional entre a expressão do *star* e *cyp17a1* tanto no grupo do BPS como do BPAF. Nas concentrações 0,5 µg/L do BPS e 50 µg/L do BPAF houve estímulo da expressão de ambos os genes, e em 0,5 µg/L do BPAF redução da expressão dos mesmos. A mesma correlação diretamente proporcional foi encontrada nos testículos de machos adultos de zebrafish após tratamento *in vivo* com 5, 25 e 125 µg/L do BPAF por 120 dias (Shi *et al*., 2015) e com 0,5, 5 e 50 µg/L do BPS por 21 dias (Ji *et al*., 2013). Juntos, os dados evidenciam que tanto o BPS como o BPAF são capazes de modular a expressão do gene *star*. No entanto, o BPAF apresentou maior capacidade de modular os níveis de mRNA do *star* em comparação ao BPS, regulando sua expressão em todas as concentrações do BPAF utilizadas. De modo semelhante, também em explantes testiculares, a expressão do *star* e *cyp17a1* também foi modulada por E2 (10 nM; 6 dias de tratamento), em correlação diretamente proporcional (De

Waal *et al*., 2009). Os dados indicam que os genes *star* e *cyp17a1* tendem a responder de forma conjunta aos compostos estrogênicos/potencialmente estrogênicos.

Quanto aos níveis de mRNA dos receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*), nenhuma concentração do BPS foi capaz de regular sua expressão. Mu e colaboradores (2018) não observaram modulação dos receptores de estrógeno (*esr1*, *esr2a* e *esr2b*) em embriões de zebrafish tratados com três diferentes concentrações do BPS (0,5; 5 e 25 mg/L). Da mesma forma, Ji e colaboradores (2013) em machos adultos de zebrafish tratados com 0,5; 5 e 50 µg/L do BPS por 21 dias, também não encontraram diferença significativa na expressão de *erα* (*esr1*) e *erβ* (*esr2b*) nos testículos. Juntos, os dados apresentados sugerem que o BPS tem pouca capacidade de modular a expressão de *esr1* e *esr2a*. Além disso, foi constatado *in silico* que o BPS tem baixa afinidade pelos receptores de estrógeno em zebrafish (Mu *et al*., 2018), o que pode justificar sua incapacidade de modular os níveis de mRNA dos receptores de estrógeno.

Diferentemente, o BPAF foi capaz de modular a expressão de *esr1* e *esr2b* na concentração de 0,5 µg/L. Mu e colaboradores (2018) constataram a inibição dos níveis de mRNA de *esr2a* e *esr2b* na concentração mais baixa de seu estudo, 0,02 mg/L. Este resultado coincide com o observado no presente trabalho, onde a menor concentração do BPAF (0,5 µg/L), diminuiu a expressão de *esr2b* e *esr1*. Estes dados são condizentes com um estudo anterior em células de linhagem humana, que indicou que o BPAF – a depender da concentração - pode atuar como agonista (doses mais altas) ou antagonista (doses mais baixas) do Erα e Er*β* (Li *et al*., 2012), podendo aumentar (doses mais altas) ou reduzir (doses mais baixas) os níveis de mRNA dos genes *esr1* e *esr2*. Além disso, Meng e colaboradores (2023) demonstraram que o BPAF (200 µg/L) estimula a expressão de erα (*esr1*) e erβ (*esr2b*) em testículos de zebrafish adultos. Juntos, em contraposição ao BPS, os resultados mostram que o BPAF tem capacidade de modular a expressão dos receptores de estrógeno.

Na literatura diversos trabalhos mostram os efeitos antiandrogênicos do BPS em diversos organismos modelo (Kitamura *et al*., 2005; Rochester & Bolden., 2015; Conroy-Ben *et al*., 2018; Pelch *et al*., 2019; Park *et al*., 2022). O desequilíbrio nos níveis de esteróides gonadais pode afetar a performance reprodutiva e o processo espermatogênico. Considerando isso, levantamos a possibilidade de o BPS ter reprimido os cistos meióticos Spc_p e os pós-meióticos Spt via interação com a síntese ou atividade de hormônios androgênicos, como a testosterona ou 11- Ketotestosterona (11-KT) os dois fisiologicamente mais relevantes andrógenos em zebrafish (De Waal *et al* 2008). O hormônio 11-KT é indutor da

espermatogênese em peixes (Miura *et al* 1991; Miura & Miura*.,* 2003; De Waal *et al* 2008) e principal hormônio androgênico em zebrafish machos adultos (De Waal *et al* 2008). Em explantes testiculares de zebrafish, o 11-KT possibilita que os cistos da linhagem germinativa realizem meiose e completem a espermatogênese, promovendo diferenciação nos estágios finais do processo espermatogênico (Leal *et al* 2009a). Desta forma, aventamos a possibilidade de um efeito estrogênico indireto, via interferência do BPS em andrógenos, em especial o 11-KT, levando a redução dos cistos de Spc $_{p}$ *e* Spt.

A inibição mediada por andrógenos na expressão gênica de genes da via esteroidogênica pode fazer parte de um ciclo de feedback negativo para prevenir superestimulo da esteroidogênese (García-Lopez *et al*., 2010). Leal e colaboradores (2009a) observaram uma relação inversamente proporcional entre a liberação de 11 KT e os níveis de *cyp17a1* em explantes testiculares em meio de cultura basal. Na concentração de 0,5 µg/L do BPS, encontramos aumento dos níveis de mRNA de *cyp17a1*, podendo sugerir queda do estímulo de 11-KT. No entanto, não quantificamos 11-KT, impedindo que a suposição seja averiguada.

Por fim, dada a capacidade singular da concentração mais baixa (0,5 µg/L) do BPAF em reprimir a proporção dos cistos meióticos Spc_p, reduzir os níveis de mRNA do gene marcador de prófase da meiose (*scyp3l)*, dos genes da via esteroidogênica (*star*, *cyp17a1*) e dos receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*) em comparação as maiores concentrações (5 µg/L e 50 µg/L) do BPAF, sugere-se uma relação não monotônica para o BPAF. Convencionalmente, a resposta aumenta proporcionalmente à dose, seguindo o dogma "a dose faz o veneno" (Villar-Pazos *et al* 2017). No entanto, diversos desreguladores endócrinos, induzem relação de dose e resposta que não são convencionais (não monotônica; NMDR), o que tem implicações significativas na avaliação de riscos. (Villar-Pazos *et al* 2017). A não monotonicidade é frequentemente observada após exposições a hormônios e EDCs em culturas de células e animais e em populações humanas. (Vandenberg *et al*., 2014). Sendo comum na literatura sobre BPA, ocorrendo dose resposta não monotônica em mais de 20% de todos os experimentos examinados (Vandenberg *et al*., 2014). No entanto, a literatura a respeito da relação entre o BPAF e monotonicidade ainda é incipiente, e precisa ser melhor estudada para compreender os mecanismos subjacentes relacionados.

Curiosamente, dentre as 3 concentrações testadas (0,5; 5 e 50 µg/L) do BPS, foi na dose de 0,5 µg/L que mais genes de enzimas esteroidogênicas (*cyp19a1a, star* e *cyp17a1*) foram afetados, indicando maior desregulação da via esteroidogênica com a concentração mais baixa.

Este achado é complementado pelo fato de que 0,5 µg/L do BPS foi a única dose que resultou em um aumento significativo na expressão do marcador de apoptose (*noxa*), sugerindo que a relação para o BPS em explantes testiculares também possa ser não monotônica.

A espermatogênese compreende uma série de modificações epigenéticas complexas, tais como metilação de DNA e remodelação de histonas por metilação ou acetilação, as quais são essenciais para a formação dos gametas masculinos. Alterações epigenéticas durante as fases pré-meiótica e meiótica podem comprometer a formação das células haploides, modificando o epigenoma dos gametas e acarretando consequências sérias não apenas no processo espermatogênico em si, mas também sobre a descendência (Hazzouri *et al*., 2000; Champroux *et al*., 2018; Gonzalez-Rojo *et al* 2019). Desta forma, o processo espermatogênico é uma janela vulnerável à exposição a substâncias epigenotóxicas (Gonzalez-Rojo *et al* 2019). No presente estudo, avaliamos os potenciais efeitos causados pelos bisfenóis alternativos BPS e o BPAF à expressão das enzimas de regulação epigenética.

Dito isso, vimos que à exposição ao BPS e ao BPAF em explantes testiculares é capaz de modificar a expressão de genes envolvidos em regulação epigenética. Nossos resultados mostram que todas as 3 concentrações do BPS (0,5; 5 e 50 µg/L) e do BPAF (0,5; 5 e 50 µg/L) foram capazes de modular a expressão das enzimas de regulação epigenéticas em diferentes intensidades. O BPS foi capaz de regular apenas a expressão da enzima envolvida em desacetilação (*hdac4*) de histonas. Não encontramos indícios de que o BPS possa interferir com a expressão de genes envolvidos nos processos de metilação e desmetilação do DNA ou metilação e desmetilação das histonas, visto que os níveis de mRNA das enzimas *dnmt5*, *tet1*, *ezh2* e *kdm6b* não foram alterados em qualquer concentração. Por outro lado, o BPAF aparenta maior capacidade de promover modificações epigenéticas, modulando a expressão de genes de todos os principais processos de regulação epigenética abordados neste estudo.

O BPAF foi capaz de regular os genes envolvidos em: metilação do DNA (estímulo do *dnmt5* com 5 µg/L); desmetilação do DNA (estímulo do *tet1* com 50 µg/L); metilação de histonas (repressão do *ezh2* com 0,5 µg/L e estímulo com 5 µg/L); desmetilação de histonas (inibição do *kdm6b* com 0,5 µg/L); acetilação de histonas (inibição do *kat6*a com 5 µg/L); e desacetilação de histonas (estímulo do *hdac4* com 0, 5 e 50 µg/L e inibição com 5 µg/L). Alterações nesses processos de regulação epigenética, sugeridos pelas modificações nos níveis de mRNA citados acima, podem modificar a informação paterna herdada pela prole, seja pelo perfil da cromatina, ou pelos RNAs transferidos via esperma (Lombó *et al*., 2019; Gonzalez

Rojo *et al* 2019, Lombó & Herráez *et al*., 2021). O desbalanço nos níveis de RNA poderia modificar a informação transferida para os embriões após fertilização, e, entre outros impactos, afetar a coordenação de eventos no zigoto (Miller & Ostermeier, 2006, Dadoune., 2009, Santiago *et al*., 2022). Gonzalez-Rojo e colaboradores (2019), avaliaram os efeitos *in vivo* do BPA na espermatogênese do zebrafish após 21 dias de exposição, encontrando estímulo da expressão do *dnmt5*, *kdm6b* e *hdac4* e redução do *kat6a* na concentração de 2000 µg/L. Igualmente, *hdac4* foi modulada em todas as concentrações (0,5; 5 e 50 µg/L) do BPS e do BPAF avaliadas. Indicando que, possivelmente, entre os principais bisfenóis (BPA, BPS e BPAF) produzidos (Qiu *et al*., 2021; Pang *et al*., 2019), a acetilação de histonas é impactada nos testículos de zebrafish.

Diversos trabalhos propõem que modificações nos níveis de mRNA do espermatozoide podem ser responsáveis por malformações na prole após exposição do paternal à bisfenóis (Lombó *et al*., 2019; Gonzalez Rojo *et al* 2019, Lombó & Herráez *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2022). Zhang e colaboradores (2022) encontraram que a exposição de machos adultos de zebrafish à 10 µg/L do BPAF por 28 dias reduz a taxa de eclosão, aumenta a mortalidade e afeta fatores comportamentais da prole. Além disso, as larvas resultantes da reprodução dos machos tratados, apresentaram redução da expressão de *dnmt5.* Ji *et al* 2013, também encontraram indícios de modificação da informação dos gametas. Ao cruzarem machos e fêmeas tratados com o BPS à 5 e 50 µg/L por 21 dias, encontraram atraso e redução da taxa de eclosão da prole, no entanto, a atividade de enzimas de regulação epigenética, ou suas expressões, não foram avaliadas no trabalho.

5. Conclusão

Neste trabalho avaliamos o efeito da exposição direta ao BPS e ao BPAF em explantes testiculares de zebrafish. Nossos resultados apontam que os efeitos *ex vivo* do BPS e do BPAF na espermatogênese sejam não monotônicos. Além disso, destacamos que a exposição ao BPS e ao BPAF é capaz de afetar a espermatogênese, reduzindo a entrada em meiose (Spc_p) e consequentemente reduzir a área ocupada pelos cistos pós-meióticos (Spt; para o BPS) a depender da concentração utilizada. Além disso, sugerimos que o efeito estrogênico do BPS na espermatogênese não seja via receptores de estrógenos, mas sim de forma indireta, por ação antiandrogênica. De modo contrário, propormos que o BPAF apresenta ação estrogênica direta via receptores de estrógeno. Adicionalmente, vimos que à exposição *ex vivo* ao BPS e ao BPAF

é capaz de modificar a expressão de genes de enzimas de regulação epigenética. Por fim, o presente trabalho fornece evidências de que a desregulação endócrina do BPS e BPAF impacta a transcrição de diversos genes nos testículos, em particular genes envolvidos na regulação epigenética, sugerindo consequências intergeracionais. Nosso estudo evidencia os efeitos tóxicos do BPS e BPAF na espermatogênese de zebrafish, reforçando as comprovações científicas sobre a toxicidade desses compostos alternativos. Estes achados destacam a urgência de implementar políticas públicas para restringir e remover essas substâncias do ambiente.

Referências

Assis, L. H. C, de Nóbrega, R. H., Gómez-González, N. E., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2018). Estrogen-induced inhibition of spermatogenesis in zebrafish is largely reversed by androgen. *Journal of Molecular Endocrinology*, *60*(4), 273-284.

Bacila, I., Cunliffe, V. T., & Krone, N. P. (2021). Interrenal development and function in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *535*, 111372.

Bhat, I. A., Dar, J. Y., Ahmad, I., Mir, I. N., Bhat, H., Bhat, R. A., ... & Sharma, R. (2021). Testicular development and spermatogenesis in fish: Insights into molecular aspects and regulation of gene expression by different exogenous factors. *Reviews in Aquaculture*, *13*(4), 2142-2168.

Braver-Sewradj, S. P., van Spronsen, R., & Hessel, E. V. (2020). Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Critical reviews in toxicology*, *50*(2), 128-147.

Cai, M., Li, Y. Y., Zhu, M., Li, J. B., & Qin, Z. F. (2020). Evaluation of the effects of low concentrations of bisphenol AF on gonadal development using the Xenopus laevis model: A finding of testicular differentiation inhibition coupled with feminization. *Environmental pollution*, *260*, 113980.

Champroux, A., Cocquet, J., Henry-Berger, J., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2018). A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: paternal epigenetic and transgenerational inheritance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*, 50.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity□ a review. *Environmental science & technology*, *50*(11), 5438-5453.

Choi, Y. J., & Lee, L. S. (2017). Aerobic soil biodegradation of bisphenol (BPA) alternatives bisphenol S and bisphenol AF compared to BPA. *Environmental science & technology*, *51*(23), 13698-13704.

Conroy-Ben, O., Garcia, I., & Teske, S. S. (2018). In silico binding of 4, 4'-bisphenols predicts in vitro estrogenic and antiandrogenic activity. *Environmental toxicology*, *33*(5), 569-578.

Crespo, D., Assis, L. H., Furmanek, T., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2016). Expression profiling identifies Sertoli and Leydig cell genes as Fsh targets in adult zebrafish testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *437*, 237-251.

CONCEA, C. (2023). Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*.

Costa, D. F., de Oliveira Ribeiro, A., Ricci, J. M. B., da Silva Rodrigues, M., de Oliveira, M. A., da Rosa, I. F., ... & Nóbrega, R. H. (2024). A83-01 and DMH1 effects in the zebrafish spermatogonial niche: Unraveling the roles of TGF-β and BMP signaling in the Fsh-mediated spermatogonial fate. *Gene*, *897*, 148082.

Dadoune, J. P. (2009). Spermatozoal RNAs: what about their functions?. *Microscopy research and technique*, *72*(8), 536-551.

Dai, W., He, Q. Z., Zhu, B. Q., & Zeng, H. C. (2021). Oxidative stress-mediated apoptosis is involved in bisphenol S-induced reproductive toxicity in male C57BL/6 mice. *Journal of Applied Toxicology*, *41*(11), 1839-1851.

Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., & Fujita, M. (2009). Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International journal of environmental research and public health*, *6*(4), 1472-1484.

De Waal, P. P., Wang, D. S., Nijenhuis, W. A., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2008). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (Danio rerio) testis. *Reproduction*, *136*(2), 225.

De Waal, P. P., Leal, M. C., Garcia-Lopez, A., Liarte, S., De Jonge, H., Hinfray, N., ... & Bogerd, J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *Journal of Endocrinology*, *202*(2), 287.

Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J. L., Boulahtouf, A., Le Maire, A., Cavailles, V., ... & Balaguer, P. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(37), 14930-14935.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., ... & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility*, *103*(1), 11-21.

Fang, Z., Gao, Y., Wu, X., Xu, X., Sarmah, A. K., Bolan, N., ... & Wang, H. (2020). A critical review on remediation of bisphenol S (BPS) contaminated water: Efficacy and mechanisms. *Critical reviews in environmental science and technology*, *50*(5), 476-522.

Feng, Y., Yin, J., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., & Shao, B. (2012). Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicology letters*, *211*(2), 201-209.

Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Smułek, W., & Grześkowiak, T. (2020). Removal of bisphenol A and its potential substitutes by biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *191*, 1100-1110.

García-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R. H., de Waal, P. P., van Dijk, W., Hemrika, W., ... & Schulz, R. W. (2010). Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology*, *151*(5), 2349-2360.

González-Rojo, S., Lombó, M., Fernández-Díez, C., & Herráez, M. P. (2019). Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, *248*, 368-379.

Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Toporova, L., & Balaguer, P. (2019). Functional profiling of bisphenols for nuclear receptors. *Toxicology*, *420*, 39-45.

Hanson, M. A., & Skinner, M. K. (2016). Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental epigenetics*, *2*(1), dvw002.

Hao, L., Ru, S., Qin, J., Wang, W., Zhang, J., Wei, S., ... & Zhang, X. (2022). Transgenerational effects of parental bisphenol S exposure on zebrafish (Danio rerio) reproduction. *Food and Chemical Toxicology*, *165*, 113142.

Harnett, K. G., Chin, A., & Schuh, S. M. (2021). BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *216*, 112210.

Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A. K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., ... & Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *European journal of cell biology*, *79*(12), 950-960.

Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., & Žegura, B. (2019). Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Science of the total environment*, *687*, 267-276.

Herráez, M. P., Ausió, J., Devaux, A., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C., Bony, S., ... & Robles, V. (2017). Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. *Aquaculture*, *472*, 45-59.

Hinfray, N., Nobrega, R. H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Marechal, E., Chadili, E., ... & Brion, F. (2013). Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *J Endocrinol*, *216*(3), 375-88.

Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., & Chung, C. Y. (2018). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology reports*, *5*, 76-84.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, *47*(15), 8793-8800.

Jiang, L., Zhang, J., Wang, J. J., Wang, L., Zhang, L., Li, G., ... & Liu, J. (2013). Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, *153*(4), 773-784.

Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews genetics*, *8*(4), 253-262.

Keminer, O., Teigeler, M., Kohler, M., Wenzel, A., Arning, J., Kaßner, F., ... & Eilebrecht, E. (2020). A tiered high-throughput screening approach for evaluation of estrogen and androgen receptor modulation by environmentally relevant bisphenol A substitutes. *Science of the total environment*, *717*, 134743.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., ... & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, *84*(2), 249-259.

Lan, H. C., Wu, K. Y., Lin, I. W., Yang, Z. J., Chang, A. A., & Hu, M. C. (2017). Bisphenol A disrupts steroidogenesis and induces a sex hormone imbalance through c-Jun phosphorylation in Leydig cells. *Chemosphere*, *185*, 237-246.

Leal, M. C., de Waal, P. P., García-López, Á., Chen, S. X., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2009a). Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo. *General and comparative endocrinology*, *162*(2), 134-138.

Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2009b). Histological and stereological evaluation of zebrafish (Danio rerio) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of reproduction*, *81*(1), 177-187.

Lee, J., Moon, K. W., & Ji, K. (2021). Systematic review of exposure to bisphenol A alternatives and its effects on reproduction and thyroid endocrine system in zebrafish. *Applied Sciences*, *11*(4), 1837.

Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., & Korach, K. S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environmental health perspectives*, *120*(7), 1029-1035.

Li, N., Ying, G. G., Hong, H., Tsang, E. P. K., & Deng, W. J. (2021a). Plasticizer contamination in the urine and hair of preschool children, airborne particles in kindergartens, and drinking water in Hong Kong. *Environmental Pollution*, *271*, 116394.

Li, C., Zhang, L., Ma, T., Gao, L., Yang, L., Wu, M., ... & Chen, H. (2021b). Bisphenol A attenuates testosterone production in Leydig cells via the inhibition of NR1D1 signaling. *Chemosphere*, *263*, 128020.

Liang, S., Yin, L., Shengyang Yu, K., Hofmann, M. C., & Yu, X. (2017). High-content analysis provides mechanistic insights into the testicular toxicity of bisphenol A and selected analogues in mouse spermatogonial cells. *Toxicological sciences*, *155*(1), 43-60.

Liao, C., Liu, F., & Kannan, K. (2012). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science & technology*, *46*(12), 6515-6522.

Lin, J., Deng, L., Sun, M., Wang, Y., Lee, S., Choi, K., & Liu, X. (2021). An in vitro investigation of endocrine disrupting potentials of ten bisphenol analogues. *Steroids*, *169*, 108826.

Loganathan, P., Vigneswaran, S., Kandasamy, J., Nguyen, T. V., Cuprys, A. K., & Ratnaweera, H. (2023). Bisphenols in water: Occurrence, effects, and mitigation strategies. *Chemosphere*, 138560.

Lo Nostro, F. L; Costa, D. F; Nóbrega, R. H; Da Cuña, R (2023). EDCs: focus on male fish reproductive alterations. *Environmental Contaminants And Endocrine Health*, [S.L.], p. 269-281.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., & Herráez, M. P. (2019). Genetic and epigenetic alterations induced by bisphenol A exposure during different periods of spermatogenesis: from spermatozoa to the progeny. *Scientific Reports*, *9*(1), 18029.

Lombó, M., & Herráez, M. P. (2021). Paternal inheritance of bisphenol A cardiotoxic effects: the implications of sperm epigenome. *International journal of molecular sciences*, *22*(4), 2125.

Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and cellular endocrinology*, *254*, 179-186.

Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., & Shimohigashi, Y. (2010). Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ERα but a highly specific antagonist for ERβ. *Environmental health perspectives*, *118*(9), 1267-1272.

McBirney, M., King, S. E., Pappalardo, M., Houser, E., Unkefer, M., Nilsson, E., ... & Skinner, M. K. (2017). Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. *PloS one*, *12*(9), e0184306.

Meng, X., Su, S., Wei, X., Wang, S., Guo, T., Li, J., ... & Wang, Z. (2023). Exposure to bisphenol A alternatives bisphenol AF and fluorene-9-bisphenol induces gonadal injuries in male zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *253*, 114634.

Miller, D., & Ostermeier, G. C. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human reproduction update*, *12*(6), 757-767.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (Anguilla japonica). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(13), 5774-5778.

Miura, T., & Miura, C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish physiology and biochemistry*, *28*, 181-186.

Moon, M. K. (2019). Concern about the safety of bisphenol A substitutes. *Diabetes & metabolism journal*, *43*(1), 46.

Morais, R. D. V. S., Nóbrega, R. H., Gómez-González, N. E., Schmidt, R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2013). Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (Danio rerio) testis. *Endocrinology*, *154*(11), 4365-4376.

Mu, X., Huang, Y., Li, X., Lei, Y., Teng, M., Li, X., ... & Li, Y. (2018). Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. *Environmental science & technology*, *52*(5), 3222-3231.

Naderi, M., & Kwong, R. W. (2020). A comprehensive review of the neurobehavioral effects of bisphenol S and the mechanisms of action: New insights from in vitro and in vivo models. *Environment International*, *145*, 106078.

Nóbrega, R. H., Morais, R. D. V. D. S., Crespo, D., De Waal, P. P., De França, L. R., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2015). Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology*, *156*(10), 3804-3817.

Pang, Q., Li, Y., Meng, L., Li, G., Luo, Z., & Fan, R. (2019). Neurotoxicity of BPA, BPS, and BPB for the hippocampal cell line (HT-22): An implication for the replacement of BPA in plastics. *Chemosphere*, *226*, 545-552.

Park, C. B., Kim, G. E., On, J., Pyo, H., Park, J. W., & Cho, S. H. (2022). Sex-specific effects of bisphenol S with tissue-specific responsiveness in adult zebrafish: The antiandrogenic and antiestrogenic effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *229*, 113102.

Pelch, K. E., Li, Y., Perera, L., Thayer, K. A., & Korach, K. S. (2019). Characterization of estrogenic and androgenic activities for bisphenol A-like chemicals (BPs): in vitro estrogen and androgen receptors transcriptional activation, gene regulation, and binding profiles. *Toxicological Sciences*, *172*(1), 23-37.

Porubek, D. (2013). CYP17A1: a biochemistry, chemistry, and clinical review. *Current topics in medicinal chemistry*, *13*(12), 1364-1384.

Qiu, W., Zhan, H., Hu, J., Zhang, T., Xu, H., Wong, M., ... & Zheng, C. (2019). The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and environmental safety*, *173*, 192-202.

Qiu, W., Liu, S., Chen, H., Luo, S., Xiong, Y., Wang, X., ... & Wang, K. J. (2021). The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms. *Journal of hazardous materials*, *406*, 124303.

Rifa, R. A., & Lavado, R. (2024). Unveiling the next generation of bisphenol analogs and their impact on human health using in vitro methods. *Emerging Contaminants*, 100296.

Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*, *123*(7), 643-650.

Rodrigues, M. S., Tovo-Neto, A., Rosa, I. F., Doretto, L. B., Fallah, H. P., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2022). Thyroid hormones deficiency impairs male germ cell development: a cross talk between hypothalamic-Pituitary-thyroid, and—gonadal axes in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 865948.

Rodriguez-Mari, A., Canestro, C., BreMiller, R. A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., & Postlethwait, J. H. (2010). Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. *PLoS genetics*, *6*(7), e1001034.

Roelofs, M. J., van den Berg, M., Bovee, T. F., Piersma, A. H., & van Duursen, M. B. (2015). Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology*, *329*, 10-20.

Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *127*(1-2), 27-34.

Saito, K., Siegfried, K. R., Nüsslein-Volhard, C., & Sakai, N. (2011). Isolation and cytogenetic characterization of zebrafish meiotic prophase I mutants. *Developmental Dynamics*, *240*(7), 1779-1792.

Santiago, J., Silva, J. V., Howl, J., Santos, M. A., & Fardilha, M. (2022). All you need to know about sperm RNAs. *Human Reproduction Update*, *28*(1), 67-91.

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, *165*(3), 390-411.

Shamhari, A. A., Abd Hamid, Z., Budin, S. B., Shamsudin, N. J., & Taib, I. S. (2021). Bisphenol a and its analogues deteriorate the hormones physiological function of the male reproductive system: A mini-review. *Biomedicines*, *9*(11), 1744.

Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*, 19-44.

Shi, J., Jiao, Z., Zheng, S., Li, M., Zhang, J., Feng, Y., ... & Shao, B. (2015). Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (Danio rerio), and the impact on offspring. *Chemosphere*, *128*, 252-257.

Thoene, M., Rytel, L., Nowicka, N., & Wojtkiewicz, J. (2018). The state of bisphenol research in the lesser developed countries of the EU: A mini-review. *Toxicology research*, *7*(3), 371-380.

Tong, S. K., & Chung, B. C. (2003). Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *86*(3-5), 381-386.

Tovo-Neto, A., Martinez, E. R., Melo, A. G., Doretto, L. B., Butzge, A. J., Rodrigues, M. S., ... & Nóbrega, R. H. (2020). Cortisol directly stimulates spermatogonial differentiation, meiosis, and spermiogenesis in zebrafish (Danio rerio) testicular explants. *Biomolecules*, *10*(3), 429.

Tumu, K., Vorst, K., & Curtzwiler, G. (2023). Endocrine modulating chemicals in food packaging: A review of phthalates and bisphenols. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *22*(2), 1337-1359.

Tzung, K. W., Goto, R., Saju, J. M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., ... & Orbán, L. (2015). Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem cell reports*, *4*(1), 61-73.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Turi, N., Ullah, W., ... & Khan, M. M. (2018). Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action. *Food and chemical toxicology*, *121*, 24-36.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., ... & Butt, M. A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, *209*, 508-516.

Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-response*, *12*(2), dose-response.

Villar-Pazos, S., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., ... & Nadal, A. (2017). Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca2+ entry in mouse pancreatic β-cells. *Scientific reports*, *7*(1), 11770.

Wu, D., Huang, C. J., Jiao, X. F., Ding, Z. M., Zhang, S. X., Miao, Y. L., & Huo, L. J. (2019). Bisphenol AF compromises blood-testis barrier integrity and sperm quality in mice. *Chemosphere*, *237*, 124410.

Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., & Wang, Y. (2016). Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget*, *7*(9), 10606.

Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., & Hou, J. (2022). A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *254*, 109275.

Xue, S., Liu, L., Dong, M., Xue, W., Zhou, S., Li, X., ... & Yan, W. (2023). Prenatal exposure to bisphenol AF induced male offspring reproductive dysfunction by triggering testicular innate and adaptive immune responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *259*, 115030.

Yang, T., Wang, L., Liu, Y., Huang, Z., He, H., Wang, X., ... & Ma, J. (2019). Comparative study on ferrate oxidation of BPS and BPAF: Kinetics, reaction mechanism, and the improvement on their biodegradability. *Water research*, *148*, 115-125.

Ye, D., Liu, T., Li, Y., Wang, Y., Hu, W., & Sun, Y. (2023). Identification of fish spermatogenic cells through high-throughput immunofluorescence against testis with an antibody set. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1044318.

Yin, L., Hu, C., & Yu, X. J. (2023). High-content analysis of testicular toxicity of BPA and its selected analogs in mouse spermatogonial, Sertoli cells, and Leydig cells revealed BPAF induced unique multinucleation phenotype associated with the increased DNA synthesis. *Toxicology in Vitro*, *89*, 105589.

Yu, X., Wu, L., Xie, L., Yang, S., Charkraborty, T., Shi, H., ... & Zhou, L. (2014). Characterization of two paralogous StAR genes in a teleost, Nile tilapia (Oreochromis niloticus). *Molecular and cellular endocrinology*, *392*(1-2), 152-162.

Zhang, L., Lv, J., Xu, T., Yang, L., Jiang, X., & Li, Q. (2013). High efficiency removal and recovery of an endocrine disrupting compound–bisphenol AF from wastewaters. *Separation and purification technology*, *116*, 145-153.

Zhang, Y., Li, T., Pan, C., Khan, I. A., Chen, Z., Yue, Y., & Yang, M. (2022). Intergenerational toxic effects of parental exposure to bisphenol AF on offspring and epigenetic modulations in zebrafish. *Science of The Total Environment*, *823*, 153714.

Capítulo 2

Bisfenol-S (BPS) tem efeito androgênico, estimula a espermatogênese e afeta o desenvolvimento e a sobrevivência dos embriões de modo intergeracional em zebrafish (*Danio rerio*)

Resumo

O Bisfenol S (BPS) é um plastificante de preocupação emergente, amplamente detectado no meio ambiente e na biota, por ter a capacidade de se dissociar dos materiais que compõem. O BPS atua como desregulador endócrino xenoestrogênico, podendo afetar a esteroidogênese e interferir com o eixo HPG (Hipotálamo-pituitária-gonadal). No presente estudo, machos adultos de zebrafish foram expostos à concentração ambientalmente relevante de BPS (0,5 µg/L) por 14 dias. Os efeitos na produção de 11-KT, espermatogênese e qualidade espermática foram investigados. Além disso, verificamos possíveis impactos do BPS na informação paterna, efetuando a reprodução com fêmeas não tratadas, onde avaliamos efeitos intergeracionais analisando eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e expressão gênica da prole. Adicionalmente, os mesmos parâmetros foram investigados em embriões diretamente expostos ao BPS (0,5 µg/L). Pela primeira vez, um efeito androgênico do BPS *in vivo* foi descrito, elevando a concentração do 11-KT no plasma e nos testículos, além de estimular os cistos meióticos (espermatócitos; Spc), pós-meióticos (espermátides; Spt) e a produção de espermatozoides (Spz). Alinhado a estas alterações histomorfométricas, a expressão gênica refletiu este ambiente pró-diferenciação, com aumento da expressão do gene marcador de prófase da meiose (*sycp3l*) e da produção de andrógenos (*cyp17a1*). Ademais, a exposição ao BPS estimulou uma série de genes envolvidos em regulação epigenética. Contudo, este efeito androgênico não se refletiu na qualidade espermática e na viabilidade dos embriões, que foram impactados negativamente. A análise da qualidade espermática revelou alterações de parâmetros da cinética dos espermatozoides, em especial a queda de motilidade. Na geração F1, houve acentuado atraso nas taxas de eclosão, notável aumento de malformações como ausência de formação de somitos e não desprendimento da cauda, além de mortalidade alta. As larvas diretamente expostas não apresentaram qualquer alteração de desenvolvimento ou aumento significativo de mortalidade. Efeitos estrogênicos não foram identificados nos adultos expostos e nas larvas F1. Todavia, as larvas diretamente expostas apresentaram aumento dos níveis de mRNA de genes marcadores de atividade estrogênica (*esr1, cyp19a1b* e *vgt1*). De forma inédita, o presente trabalho identificou efeito intergeracional do BPS na informação paterna, demonstrando que expor o macho parental ao BPS foi mais prejudicial ao desenvolvimento e sobrevivência dos embriões do que a exposição direta dos embriões ao BPS. Por fim, nosso trabalho proporciona maior compreensão das consequências do BPS na fisiologia de peixes. Aqui, ampliamos a perspectiva a respeito dos efeitos do BPS na produção hormonal, espermatogênese, qualidade espermática e informação paterna sobre a viabilidade da prole.

1. Introdução

O bisfenol S (4-hydroxyphenyl sulfone; BPS) é um plastificante substituto ao BPA (BPA-free) que possui uma série de aplicações industriais, como a produção de colas epóxi, plásticos de policarbonato, papéis térmicos de recibos e produtos voltados para o consumo, como enlatados, embalagens de alimentos e garrafas d'água. (Ji *et al*., 2013; Wu *et al*., 2019; Tumu *et al*., 2023; Fu *et al*., 2024). Além disso, os bisfenóis, incluindo o BPA e seus análogos, podem dissociar-se dos materiais que compõem, ocorrendo transferência para o meio ambiente e a biota (revisado por Lo Nostro *et al*., 2023). O BPS foi detectado em amostras humanas de urina (Liao *et al*., 2012) e sangue (Fu *et al*., 2024); e está presente em sedimentos, poeira de residências e águas de superfície (Qiu *et al*., 2019). Em águas de superfície, pode exceder 1µg/L, com concentração máxima reportada de 6,84 µg/L no rio Adyar, Índia (Yamazaki *et al*., 2015, Qiu *et al*., 2019). Em alguns ambientes aquáticos, como o Pearl River (China) e o Adyar River (Índia) o BPS já ultrapassa a concentração do BPA (Yamazaki *et al*., 2015). Visto ainda que o BPS é o principal substituto ao BPA (Mornagui *et al*., 2019) e mais resistente a biodegradação (Frankowski *et al*., 2020; Yang *et al*., 2019), luminosidade e temperatura (Fang *et al*., 2020) é plausível projetar que o BPS possa ultrapassar as concentrações ambientais do BPA, causando impactos ecológicos que precisam ser melhor investigados, em especial, nos organismos aquáticos, devido a sua alimentação, reprodução e desenvolvimento em ininterrupto contanto com contaminantes ambientais.

O BPS é considerado um contaminante ambiental de preocupação emergente (Cesen *et al*., 2019; González-Rubio *et al*., 2021; Askarniya *et al*., 2023), um composto xenoestrogênico capaz de se ligar aos receptores de estrógeno (Mornagui *et al*., 2019; Mu *et al*., 2018), sendo, portanto, considerado um desregulador endócrino (EDC) (Perera *et al*., 2017; Hercog *et al*., 2019; Cambien *et al*., 2023). A reprodução em peixes é regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG) através de interações coordenadas entre os hormônios esteroides produzidos pelas gônadas (Ma *et al*., 2012; Ji *et al*., 2013). Por ser um composto estrogênico/e ou antiandrogênico, o BPS pode interferir na produção de estrógenos e andrógenos e consequentemente no eixo HPG, afetando a reprodução dos peixes (Liu *et al*., 2010; Ji *et al*., 2013; Chen *et al*., 2016; Hercog *et al*., 2019; Lee *et al*., 2021). Em mamíferos, alguns estudos têm mostrado que o BPS prejudica a espermatogênese (Ullah *et al*., 2018; Dai *et al*., 2021; Darghouthi *et al*., 2022; Molangiri *et al*., 2022). No entanto, em peixes, os mecanismos de moleculares dos efeitos do BPS na espermatogênese permanecem desconhecidos.

Recentemente, houve aumento substancial de publicações que descrevem os efeitos dos EDCs na reprodução dos peixes, com foco na qualidade dos gametas (Carnevali *et al*., 2018). Dentre os EDCs estudados, foi demostrado que bisfenóis podem reduzir a qualidade espermática, sendo relatado alterações na densidade, motilidade e fertilidade dos espermatozoides em diversas espécies (vom Saal *et al*., 1998; Ruan *et al*., 2015, Chen *et al*., 2017; Carnevali *et al*., 2018; Sahu *et al*., 2023, Torres-Badia *et al*., 2023; Ryu *et al*., 2023; Presunto *et al*., 2023). Trabalhos anteriores em mamíferos tenham demonstrado que o BPS foi capaz de afetar a qualidade espermática, alterando parâmetros como concentração e motilidade (Sahu *et al*., 2023, Torres-Badia *et al*., 2023; Shi *et al*., 2017), faltam estudos que avaliem os efeitos do BPS na qualidade espermática em peixes.

A maiorias dos poluentes ambientais não são mutagênicos, mas podem aumentar o risco de doenças transgeracionais por meio de mecanismos epigenéticos (Jirtle & Skinner, 2007; Hanson & Skinner, 2016; Hao *et al*., 2022).Considerando que a espermatogênese envolve uma série de complexas modificações epigenéticas, como metilação de DNA e remodelação de histonas; e que tais alterações durante este processo podem ter consequências para as próximas gerações (Hazzouri *et al*., 2000; Strazzullo *et al*., 2017; Champroux *et al*., 2018; Gonzalez-Rojo *et al*., 2019), torna-se evidente que o processo espermatogênico constitui uma janela vulnerável à exposição a substâncias epigenotóxicas (Pilsner *et al*., 2017; Gonzalez-Rojo *et al*., 2019). Desta forma, é de suma importância verificar as consequências do BPS na informação paterna, bem como na prole subsequente.

Dado o contexto e motivos supramencionados, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in vivo* do BPS na função testicular, produção e qualidade dos espermatozoides e os possíveis efeitos intergeracionais da exposição paterna ao BPS. Para a função testicular, avaliamos a capacidade esteroidogênica através da liberação de 11-KT, composição dos cistos espermatogênicos e de expressão dos genes marcadores da linhagem germinativa, esteroidogênese, receptores de estrógenos e enzimas de regulação epigenética. Em relação aos espermatozóides, investigamos diversos parâmetros como quantidade, motilidade e nado. Para estimar os impactos do BPS na informação paterna, foi efetuada a reprodução com fêmeas não tratadas, onde avaliamos possíveis danos na próxima geração, analisando a eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e expressão gênica da prole. Adicionalmente, os mesmos parâmetros foram examinados em embriões diretamente expostos ao BPS.

2. Material e métodos

2.1 Animais

Machos adultos de zebrafish (*Danio rerio*) foram criados e mantidos no Biotério de organismos aquáticos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, UNESP (Botucatu, Brasil) e Department of Biological Sciences, University of Calgary (Calgary, Alberta, Canadá). Os peixes foram alojados em tanques de 6 L em um sistema de recirculação de água, mantidos a uma temperatura constante de 28 °C e submetidos a um fotoperíodo controlado de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Os parâmetros como salinidade, pH, oxigênio dissolvido e amônia foram monitorados diariamente. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com uma dieta de ração seca comercial (Zeigler®). Todas as práticas de manejo e experimentação seguiram as diretrizes estabelecidas pela legislação brasileira, regulamentadas pelo Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2023) e pelos Princípios Éticos em Pesquisa Animal da Instituição (Protocolo 6605200721-CEUA) e diretrizes da University of Calgary Care.

2.2 Químicos

O bisfenol S (4 hydroxyphenyl sulfone; BPS, 99,7% de pureza) foi adquirido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) conforme instrução do fabricante. A escolha da concentração de 0,5 µg/L foi baseada em trabalhos prévios onde constam concentração igual (Ji *et al*., 2013) ou acima (Wei *et al*., 2018, Gyimah *et al*., 2021; Salahinejad *et al*., 2024) como ambientalmente relevantes. Além disso, Yamazaki e colaboradores 2015 encontraram concentrações superior em diversas localidades na India, como rio Adyar (média = 6,84 µg/L), Canal Buckingham (média = 1,08 µg/L), rio Cooum (média = 0,76 µg/L) e lago Taihu (range de 4.5 – 1600 ng/L) na China (Qiu *et al*., 2019).

2.3 Design experimental

2.3.1 Macho parental exposto ao BPS

Machos adultos de zebrafish (n= 96) foram expostos à concentração nominal ambientalmente relevante do BPS (0,5 µg/L) ou ao controle DMSO (0,00001% v/v) diluídos na água dos aquários por 14 dias (Wang *et al*., 2020), período que abrange dois ciclos

espermatogênicos (Leal *et al*., 2009a). Os animais foram distribuídos em aquários de 10 L, contendo 12 animais por aquário em um sistema semi-estático, com trocas totais da água contendo os tratamentos a cada 2 dias (Ji *et al*., 2013). Os zebrafish foram divididos em quatro tanques réplicas por grupo experimental, sendo 48 animais para cada grupo. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Pentair Aquatic Habitats, Florida, USA) e tiveram os parâmetros de qualidade da água (concentração de amônia, oxigênio, pH) aferidos e controlados. Após 14 dias, 84 animais foram eutanasiados por imersão em solução de Benzocaína a 0,1%, tendo como destino as análises de quantificação hormonal (11-KT), de expressão gênica, histomorfometria/contagem espermática e qualidade espermática via análise com o software ImageJ/Plugin Casa. Para obtenção dos embriões, 6 machos adultos tratados com BPS foram reproduzidos com fêmeas não tratadas na razão 2:1 (machos: fêmeas). Além disso, 6 machos (DMSO) também foram reproduzidos com fêmeas não tratadas; as reproduções foram realizadas em três aquários réplicas para cada grupo. Após a reprodução, os embriões viáveis foram coletados e distribuídos em placas de 24 poços (contendo 1 embrião por poço) com 1 mL de meio de cultura para embrião (Hank's medium https://www.zfin.org/zf_info/zfbook/chapt10.html#hank1) e mantidos à 28°C. Os embriões, 100 para cada grupo, foram analisados por 96h; o meio de cultura foi totalmente renovado a cada 24 horas ao longo do período de análise. Os embriões foram submetidos a análise de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência através do protocolo FET teste (OECD, 236) adaptado. Após esta etapa, as larvas F1 foram imediatamente congelados a -80°C para análise de expressão gênica (sendo 6 pools de 10 larvas para cada tratamento; n = 60 por grupo).

2.3.2 Embriões/larvas diretamente expostos ao BPS

Machos e fêmeas de zebrafish não tratados foram reproduzidos na razão 2:1 (machos: fêmeas) em três aquários réplicas para cada grupo. Os embriões obtidos foram distribuídos em placas de 24 poços (contendo 1 embrião por poço) com 1 mL de meio de cultura para embrião (Hank's medium) e mantidos à 28°C. Os embriões receberam tratamento com 0,5 µg/L de BPS ou DMSO (0,00001% v/v) (n=100 para cada condição experimental) por 96h; o meio de cultura foi totalmente substituído a cada 24 horas com reposição dos tratamentos ao longo do período de análise. Os embriões foram submetidos a análise de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência através do protocolo FET teste (OECD, 236) adaptado. Após esta etapa, as larvas

foram imediatamente congelados -80°C para análise de expressão gênica (sendo 6 pools com 10 larvas para cada tratamento; n = 60 por grupo).

2.4 Quantificação plasmática de 11-KT

Depois dos 14 dias de exposição, zebrafish machos (grupos BPS e controle) (n= 8 por condição) foram eutanasiados, e amostras de sangue foram coletadas através do corte do pedúnculo caudal utilizando seringas heparinizadas. O plasma foi isolado através da centrifugação do sangue à 4°C por 15 min a 800 x g. Os níveis plasmáticos de 11-KT foram analisados individualmente e quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA) com kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como nanograma de 11-KT por mL de plasma.

2.5 Quantificação de 11-KT liberada no meio de cultura pelos testiculos (*ex vivo*)

Depois dos 14 dias de exposição, para avaliar a liberação de 11-KT dos testículos, zebrafish machos (grupos BPS e controle) (n= 8 por condição) foram eutanasiados, e seus testículos dissecados e cultivados utilizando um método *ex vivo* de cultura de órgãos descrito anteriormente (Leal *et al*., 2009b). Cada testículo de zebrafish foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (0,25 cm^2, 25µm de espessura e 0,22 µm de porosidade) no topo de um cilindro de agarose (1,5% p/v, solução de Ringer, pH 7,4) e colocado em uma placa de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura (L-15). Um testículo (grupo BPS ou controle) foi incubado em presença de 200 ng/ml de rzf Fsh ou L-15 somente enquanto seu contralateral foi incubado em meio de cultura (L-15 somente) por 48 h. O Fsh estimula a liberação de 11-KT em peixes (Oath *et al*., 2007, Skaar *et al*., 2011; Fallah *et al*., 2021) e foi utilizado como controle positivo na liberação de 11-KT no meio de cultura. Além disso, verificamos se o Fsh é capaz de alterar o efeito da exposição ao BPS na liberação de 11-KT nos testículos. Após às 48 h, os testículos foram individualmente pesados e o meio de cultura foi coletado e processado para quantificação do 11-KT liberado pelos testículos conforme descrito previamente (Cavaco *et al*., 1998). Os níveis de 11-KT liberados no meio de cultura foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit comercial (Cayman Chemical), conforme instruções do fabricante, e expressos como ng de 11-KT/mg de testículos.

2.6 Análises histomorfométricas dos testículos

Testículos de zebrafish (n = 8 para cada condição experimental) foram fixados overnight em Karnovisky (Glutaraldeído 4% paraformaldaído 8% em tampão fosfato pH 7.2) desidratados, embebidos em em Technovit (7100-Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha), seccionados em cortes de 3µm de espessura (não seriados), e corados com azul de toluidina 0,1% para quantificação dos diferentes tipos de cistos de células germinativas. As lâminas histológicas foram fotografadas na objetiva de 100x do microscópio de luz de alta resolução (Leica DM600 BD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera JVC e um computador com o programa Leica QWIN. Imagens dos testículos de cinco campos não sobrepostos escolhidos aleatoriamente por animal (n = 8 lâminas por grupo) foram analisados quantitativamente. A análise foi realizada utilizando uma grade de 540 interseções e com base no número de pontos contados sobre os diferentes tipos de células germinativas investigados: espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócitos (Spc) e espermátides (Spt) (Fallah *et al*., 2021, Rodrigues *et al*., 2021). Utilizando critérios já estabelecidos na literatura para células germinativas de zebrafish, como tamanho do núcleo, número de células germinativas por cisto e grau de compactação da cromatina (Leal *et al*., 2009a; Schulz *et al*., 2010; Morais *et al*., 2013). A proporção de área ocupada pelos diferentes tipos de cistos germinativos foi representada como fold-change do grupo controle. Para quantificar o número relativo de espermatozoides por testículo, imagens histológicas dos testículos foram analisadas em software (ImageJ, NIH, Maryland, EUA). Para tanto, foram utilizados 20 campos não sobrepostos escolhidos aleatoriamente (objetiva de 100x) por lâmina histológica (n = 6 para cada grupo experimental) (Rodrigues *et al*., 2021, Rodrigues *et al*., 2022). Para tanto, os espermatozoides foram quantificados utilizando o plugin Cell counter do Image J. Após contar todos os espermatozoides por campo, calculou-se a média dos 20 campos e os valores foram expressos como fold-change em relação ao grupo controle.

2.7 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O RNA total (n = 8 para cada condição experimental) foi extraído usando o reagente comercial Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, Unites States) de acordo com instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado como descrito previamente (Nóbrega *et al*., 2010). Reações de qPCR foram conduzidas utilizando 10 µL de 2x SYBR-Green Universal Master Mix, 2 µL

de primer forward (1125 nM), 2 µL de primer reverse (1125 nM), 1 µL de água DEPC, e 5 µL of cDNA. Os níveis de mRNA dos genes marcadores de espermatogônias, como *pou5f3* (POU domain, class 5, transcription factor 3), *nanog* (nanog homeobox), *dazl* (deleted in azoospermia-like); e marcador de prófase da meiose *sycp3l* (synaptonemal complex protein 3) foram avaliados. Além disso, também quantificamos a expressão gênica de enzimas da via esteroidogênica, *cyp19a1a* (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a), *star* (steroidogenic acute regulatory) e *cyp17a1a* (17α-hydroxylase/17,20 lyase/17,20 desmolase); receptores de estrógeno, *esr1*, *esr2a*; e genes de regulação epigenética, *dnmt5* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase beta, duplicate b.3) , *tet1* (tet methylcytosine dioxygenase 1), *ezh2* (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit), *kdm6b* (lysine (K)-specific demethylase 6B), *kat6a* (K(lysine) acetyltransferase 6A) e *hdac4* (histone deacetylase 4). Nas larvas F1 e diretamente expostas (n= 60 por grupo), foram avaliados os níveis de mRNA dos genes relacionados ao desenvolvimento, *mstn1* (Myostatin), *vegfa* (vascular endothelial growth factor A) e *wnt8* (protein Wnt-8a); estrógeno, *esr1*, *cyp19a1b* (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1b) e *vgt1*(vitellogenin 1); e andrógeno *hsd11β2* (hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2). As expressões dos alvos de mRNA (CTs) foram normalizadas utilizando o gene β-actina como referência, que teve seus níveis de expressão estáveis entre os grupos experimentais. Os resultados foram expressos como valores relativos ao grupo controle (como fold induction), usando o método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. Primers (Tabela 1) foram desenhados de acordo com as sequências genéticas do zebrafish disponíveis no GenBank (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Target	**Primers sequence (5´- 3´)**	**Access (NCBI)**
β-actin	AGACATCAGGGAGTGATGGT	Fw BC045846
	CAATACCGTGTCAATGGGG	Rv
pou5f3	GAGAGATGTAGTGCGTGTAT	Fw BC049295.1
	GCTCGTAATACTGTGCTTCA	Rv
nanog	TGTCCTACAACAAGACTGAGCC	Fw BC162315.1
	CAGGAATCTGGCGTGTGGG	Rv
dazl	AGTGCAGACTTTGCTAACCCTTATGTA	Fw BC076423.1
	GTCCACTGCTCCAAGTTGCTCT	Rv
star	CCTGGAATGCCTGAGCAGAA	FW AF220435
	ATCTGCACTTGGTCGCATGAC	Rv
cyp17a1	GGGAGGCCACGGACTGTTA	FW NM_212806.3
	CCATGTGGAACTGTAGTCAGCAA	Rv
sycp3l	AGAAGCTGACCCAAGATCATTCC	FW BC115343
	AGCTTCAGTTGCTGGCGAAA	Rv

esr1	GGTCCAGTGTGGTGTCCTCT	FW NM_152959.1
	AGAAAGCTTTGCATCCCTCA	Rv
esr2a	GCCGACTCCGAAAGTGCTAT	FW NM_180966.2
	AGTGATATGCGCACCACCTC	Rv
dnmt5	TCATTGACTTGGGGGAAGAG	FW AB196916.1
	GCTGCTGCTGCACTTATCAT	Rv
tet1	GCAACCACTCCCATCCTTCGAC	FW XM_021472702.1
	TGTTAGCGACTGACGGGTAGGGAC	Rv
ezh2	CAGACTCATCGGCACAAAGA	FW NM_001077279.1
	TGACACAAGGGCAAGAACTG	Rv
kdm6b	GCCGTCAACGAAGTCCTATC	FW NM_001030178.2
	CTCCTTGTGCCTCTTCTTGG	Rv
kat6a	CACCAGAGAAGCCACTGTCA	FW NM_001123312.4
	TAATTACCCCGTCCCCTTTC	Rv
hdac4	TGTGTTTCTGCTTTGCTTGG	FW NM_001123312.4
	GTGACCGTCTCTGCCTCTTC	Rv
mstn1	GTCCGGTGCGTGGTGAGGTTC	FW AF540956.1
	AGCTCGCTTTCCTCCGTGGC	Rv
vegfa	TGCTCCTGCAAATTCACACAA	FW NM_131408.3
	ATCTTGGCTTTCACATCTGCAA	Rv
wnt8	GGACTACATGGAACTGAAGG	FW KM655723.1
	CTGTCTCAATCCTCCTCTCTT	Rv
esr1	ACTCTCACCCATGTACCCTAAGG	FW NM_152959.1
	CGGGTAGTATCCCACTGAAGC	Rv
cyp19a1b	AAAGAGTTACTAATAAAGATCCACCGGTAT	FW AF226619.1
	TCCACAAGCTTTCCCATTTCA	Rv
vgt1	AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG	FW NM_170767
	GATGGGAACAGCGACAGGA	RW
hsd11β2	GGGGGTCAAAGTTTCCACTA	FW NM_212720.2
	TGGAAGAGCTCCTTGGTCTC	Rv

2.8 Análise da qualidade espermática

Machos de zebrafish dos grupos BPS e controle (n= 10 por condição) foram eutanasiados e seus testículos dissecados. Os testículos foram imersos em solução salina balanceada de Hank (HBSS) para auxiliar na liberação do esperma (Chen *et al*., 2017) e mantê-lo inativado (Babiak *et al*., 2012), além disso, os testículos foram gentilmente fragmentados com o auxílio de uma pinça para facilitar a dissociação do sêmen. O sêmen seguiu então para a análise da qualidade espermática, na qual as amostras foram então diluídas em água Miliq para ativação espermática (proporção 1 µL de sêmen para 2 µL de água) e pipetadas em câmara de

Neubauer espelhada (0,1 mm profundidade), coberta por lamínula de vidro (24x24mm) (Sanches *et al*., 2013). A câmara foi rapidamente levada ao microscópio de luz trinocular (Solarist Bel) previamente focado em objetiva de 10x acoplado com uma câmera Basler acA640-120gc (http://www.baslerweb.com), conectada ao computador (intel core i7© CPU 2,4 GHz, 8Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows 8©. Com isso, foram gravados vídeos (100 frames por segundo) para realização das análises dos parâmetros computadorizados conforme procedimentos detalhados por Sanches e colaboradores (2013), por meio do software livre ImageJ/plugin CASA. Foram avaliados o número total de espermatozoides e os parâmetros de cinética: percentual de Taxa de Motilidade (MOT), Velocidade Curvilinear (VCL), Velocidade Média de Deslocamento (VAP) e Velocidade em Linha Reta (VSL).

2.9 Análise de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência dos embriões (FET) teste adaptado

Os embriões/larvas foram analisados por meio da lupa Olympus mcv10 com auxílio de lentes X-citem120 LED por 96h, a cada 24h foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos que indicam dano ao embrião e potencial letalidade, sendo eles: Coagulação dos ovos fertilizados, ausência da formação de somitos, não separação da cauda do saco vitelínico, perda dos batimentos cardíacos (a partir de 48h), deformidades da coluna espinhal, e presença de edema de saco vitelínico e pericárdico (adaptado de OECD 236, Fish Embryo Acute Toxicity, FET, Test). Também foram observadas as taxas de eclosão (a partir de 48h) definidas por: Taxa de eclosão (%) = (número de embriões eclodidos/total de embriões) x 100. Além disso, a taxa de mortalidade foi determinada pela soma dos embriões coagulados ou com perda de batimento cardíaco ao longo das 96h.

2.10 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido de Teste de variância e homogeneidade de Bartlett. A comparação entre os grupos para a quantificação do 11-KT no plasma foi realizada por teste t não pareado, enquanto a comparação da liberação de 11-KT pelos testículos entre os diferentes grupos se deu pelo teste one-Way ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os dois grupos na histomorfometria e expressão gênica foram identificadas usando o teste t não pareado ($p <$

0,05). Os parâmetros da qualidade espermática gerados pelo software ImageJ/plugin CASA foram comparados entre os grupos por meio do teste t não pareado. Os dados de eclosão e desenvolvimento dos embriões foram comparados entre os grupos pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Para a análise de sobrevivência, foi construída a curva Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos se deu pelo teste não paramétrico log-rank (Mantel cox). Os dados foram apresentados como média ± SEM (erro padrão da média). Para todas as análises estatísticas utilizamos o software GraphPad Prism (versão 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA, http://www.graphpad.com).

3. Resultados

3.1 Efeito do BPS na concentração do 11-Ketotestosterona (11-KT) do zebrafish

No presente estudo, para avaliar o impacto do BPS na produção de andrógeno, aferimos a concentração do 11-KT *in vivo* através da quantificação plasmática (Fig 1A) e *ex vivo* nos meios de cultura após 2 dias de incubação dos testículos dos animais expostos *in vivo* (Fig 1B). Nossos resultados mostram que a exposição do BPS aumentou significativamente os níveis plasmáticos de 11-KT, aproximadamente 3 vezes mais que a concentração do grupo controle (Fig 1A). Nos testículos, a quantificação do 11-KT liberado nos meios de cultura, também mostrou que a exposição ao BPS *in vivo* induziu maior liberação de 11-KT em relação ao grupo controle (Fig 1B). A exposição *in vivo* ao BPS nulifica os efeitos estimulatórios do Fsh na liberação de andrógenos em relação ao grupo controle (Fig 1B).

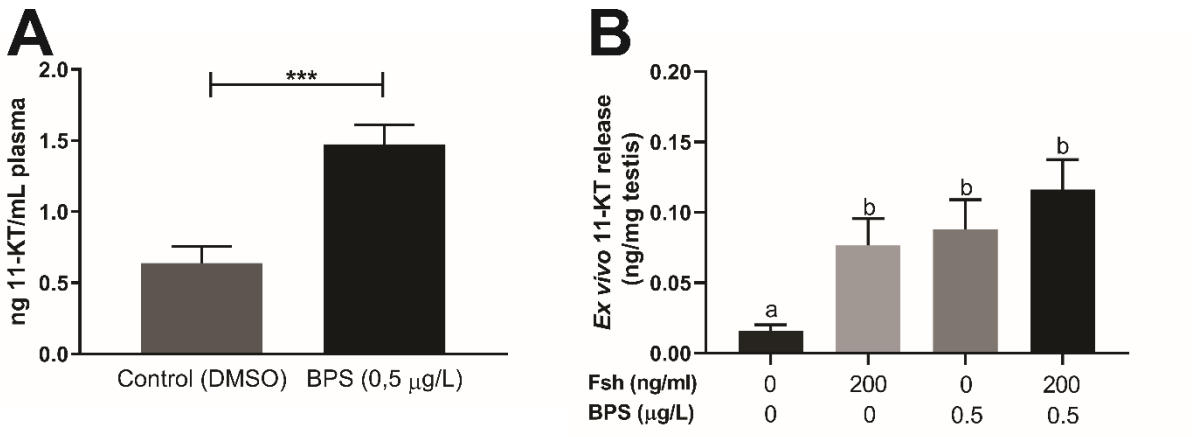


Fig. 1. Quantificação do 11-KT após exposição ao BPS. (A) Níveis plasmáticos de 11-Ketotestosterona (11-KT) (ng/mL de plasma) em machos de zebrafish após 14 dias de exposição ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L). (B) Liberação de 11-KT pelos explantes testiculares de zebrafish previamente tratados com DMSO ou BPS (0,5 µg/L) por 14 dias. Testículos incubados em meio de cultura (L-15) em presença ou ausência de Fsh (200 ng/ml)

por 48 h. As barras representam a média ± SEM (n = 8). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. (***) representa diferença significativa ($p<0,001$).

3.2 Análise histomorfométrica dos efeitos do BPS na espermatogênese do zebrafish

O tratamento com BPS promoveu aumento significativo da proporção de área ocupada por espermatócitos (Spc) e espermátides (Spt) em relação ao grupo controle, demonstrando estímulo dos estágios finais da espermatogênese (Fig 2A). No entanto, a área ocupada pelos cistos de espermatogônias indiferenciadas (A_{und}) foi reduzida após a exposição com BPS, enquanto os demais cistos espermatogoniais (A_{diff} e SpgB) não sofreram alterações (Fig 2A). Além disso, a quantificação do número relativo de espermatozoides apresentou aumento significativo após o tratamento com BPS (Fig 2B).

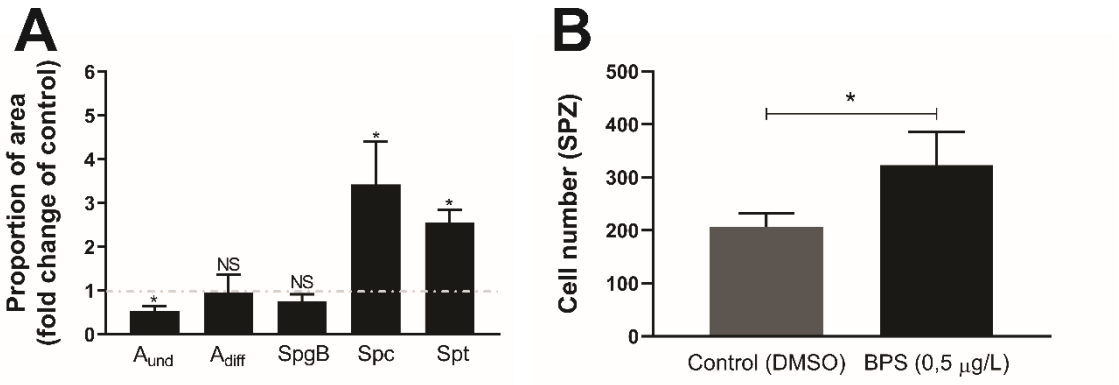


Fig. 2. Análises histomorfométricas dos testículos após exposição ao BPS. (A) Proporção de área de superfície ocupada por cistos espermatogênicos após 14 dias de exposição ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L). Cistos de espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócito primário (Spc) e espermátides (Spt). Dados representados como fold change do grupo controle. (B) Número de espermatozoides por campo obtidos através do IMAGEJ Software. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=6). (*) representa diferença significativa observada entre os diferentes grupos com $p < 0,05$; (NS) sem diferença significativa.

3.3 Análise de expressão gênica dos efeitos do BPS na espermatogênese do zebrafish

O BPS afetou a expressão gênica dos testículos após os 14 dias de exposição em relação ao grupo controle (Fig 3A-D). Os níveis de mRNA dos genes marcadores de espermatogônias (*pou5f3*, *nanog* e *dazl*) não foram modulados pelo BPS (Fig 3A). Em contraste, ocorreu aumento significativo dos transcritos de *sycp3l* (marcador de espermatócito primário) (Fig 3A) e das enzimas esteroidogênicas *star* e *cyp17a1* após exposição ao contaminante (Fig 3B). Não

houve alteração de expressão gênica dos receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*) (Fig 3C). Por fim, à exposição ao BPS modulou os níveis de mRNA das enzimas de regulação epigenética, estimulando a transcrição de *dnmt5*, *tet1*, *kat6a* e *hdac4* (Fig 3D).

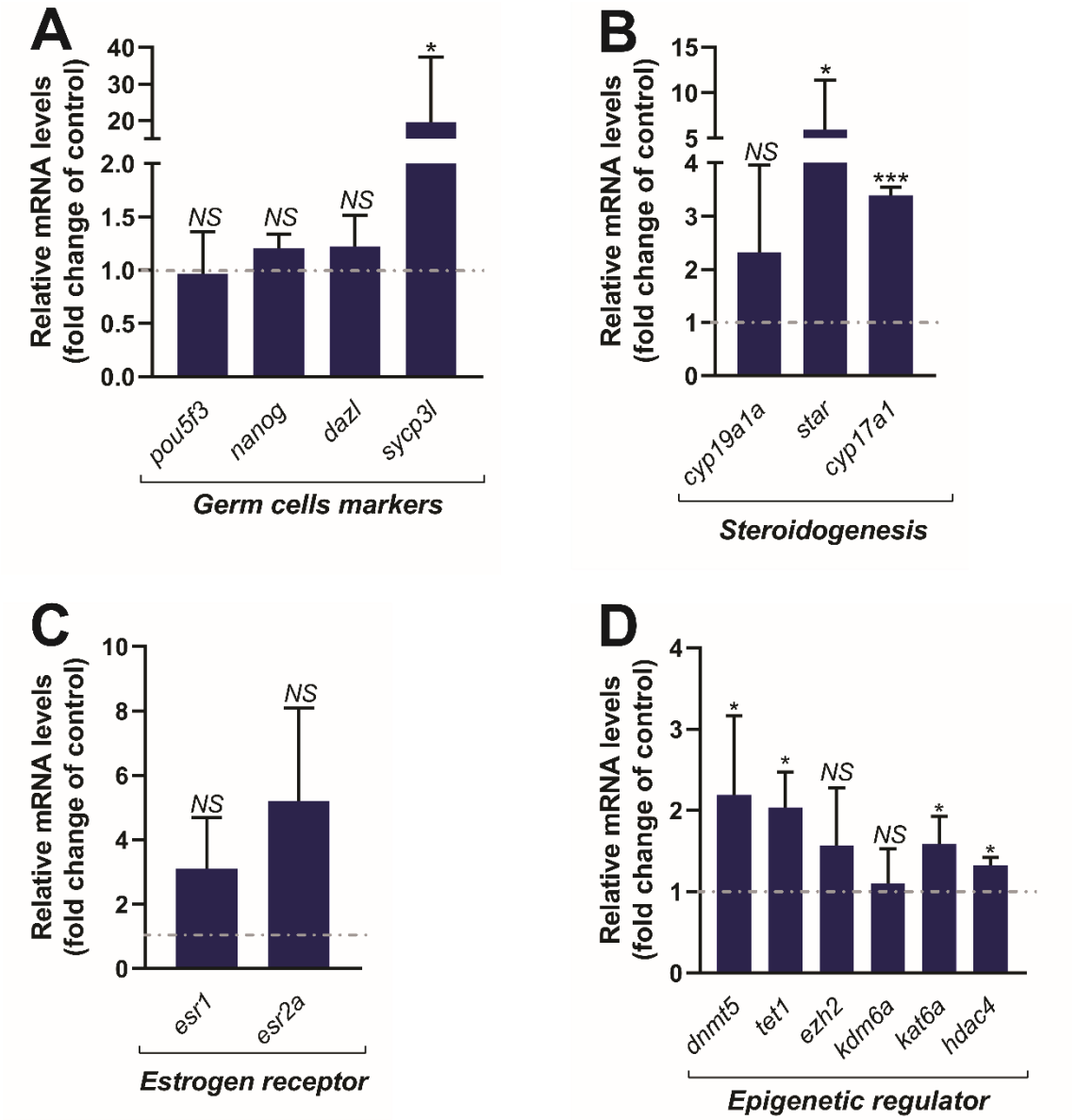


Fig. 3. Análise de expressão gênica dos testículos após exposição ao BPS. (A) Expressão relativa dos genes marcadores de células germinativas (*pou5f3*, *nanog*, *dazl* e *scyp3l*), enzimas de esteroidogênese (*cyp19a1a*, *star*, *cyp17a1*), receptores de estrógeno (*esr1*, *esr2a*), e regulação epigenética (*dnmt5*, *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4*) em testículos de zebrafish após 14 dias exposição ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L). Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β-actina) e expressos relativos ao grupo controle (DMSO). Os dados estão apresentados com a média ± erro padrão (n=8) e como fold induction do controle (DMSO) representado pela linha tracejada. (*) e (***) representam diferença significativa com $p < 0,05$ e $p<0,001$, respectivamente. (NS) sem diferença significativa.

3.4 Efeitos do BPS na qualidade espermática dos zebrafish

A exposição *in vivo* ao BPS afetou a qualidade espermática em comparação ao grupo controle, resultando em um aumento significativo na produção de espermatozoides ($p < 0,01$) (Fig. 4A). Além disso, houve alterações nos parâmetros de cinética espermática (Fig. 4B-E), como a motilidade (MOT) e a velocidade curvilinear (VCL), observando-se uma redução na motilidade (Fig. 4B) e um aumento na velocidade curvilinear (Fig. 4C). Os parâmetros velocidade média de deslocamento (VAP) (Fig 4D) e velocidade em linha reta (VSL) (Fig 4E) não foram impactados.

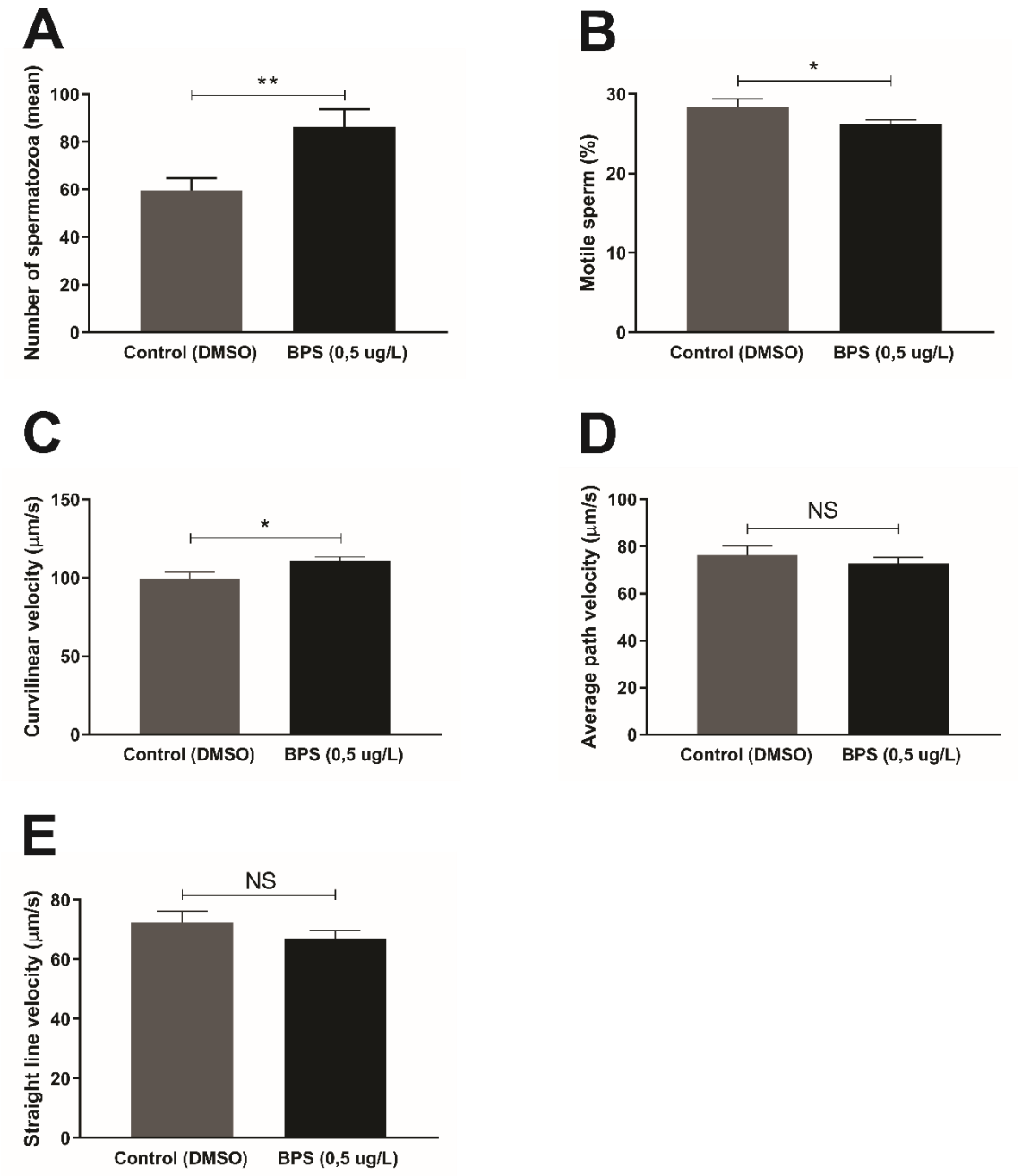


Fig. 4. **Análise de motilidade (COMPUTADORIZADA – CASA) dos espermatozoides após exposição do zebrafish ao BPS.** Parâmetros de cinética espermática após 14 dias exposição ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L) determinados pelo software CASA. Foi utilizado H_2O como ativador dos espermatozoides tanto no grupo controle (DMSO) como no grupo BPS (0,5 µg/L). (A) Número de espermatozoides (Média), (B) Taxa de Motilidade (MOT, %), (C) Velocidade Curvilinear (VCL, µm/s), (D) Velocidade Média de Deslocamento (VAP, µm/s), (E) Velocidade em Linha Reta (VSL, µm/s). Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=10). (*) e (**) representam diferença significativa com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. (NS) sem diferença significativa.

3.5 Efeitos da exposição do macho parental ao BPS na eclosão, desenvolvimento e sobrevivência dos embriões/larvas da geração F1 e diretamente expostos

Machos parentais expostos ao BPS resultaram em atraso e redução das taxas de eclosão dos embriões da geração F1, com taxa final de eclosão de 70% comparado à 95% do grupo controle após as 96 h de análise (Fig 5A). Além disso, observamos altas taxas de malformações, como atraso e ausência de formação de somitos (Fig 5C) e não desprendimento da cauda (Fig 5D) com nível de significância ($p < 0,0001$) nos quatro períodos analisados (24, 48, 72 e 96 h); e diferença final (96h) de 27% no grupo BPS comparado a 2% do grupo controle para os dois parâmetros (Fig 5C e D). Os demais parâmetros avaliados, edema pericárdico (Fig 5E) e deformidades da coluna espinhal (Fig 5F) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Edema de saco vitelínico tanto no grupo controle como no grupo BPS não foram observados (0%). Os embriões diretamente expostos ao BPS não tiveram qualquer alteração significativa nas taxas de eclosão ao longo das 96 h (Fig 5B). Ademais, nenhuma malformação (0%) foi observada tanto no grupo controle como no grupo BPS para os parâmetros avaliados.

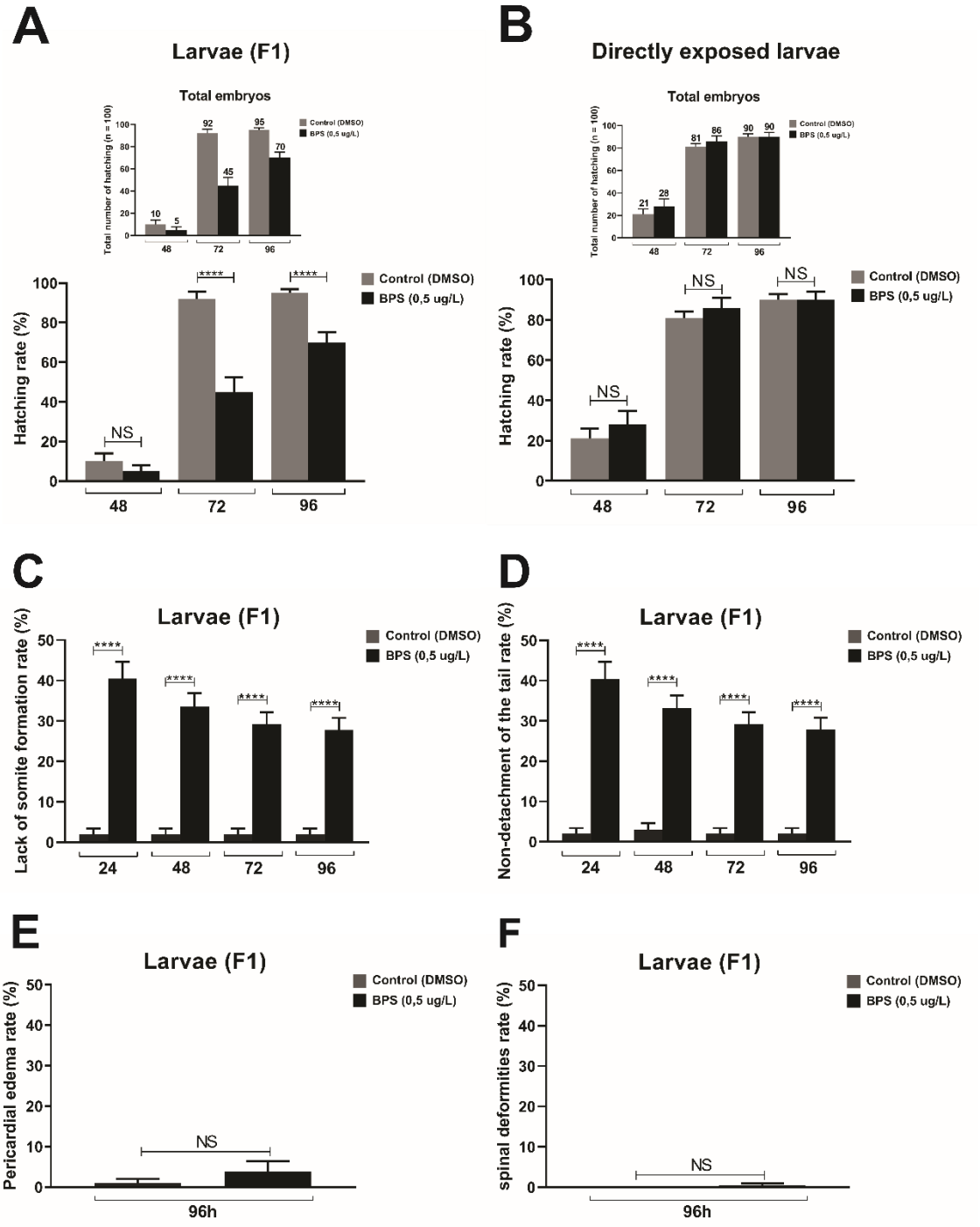


Fig. 5. Efeitos na eclosão e desenvolvimento de embriões/larvas de zebrafish. (A) Eclosão das larvas (F1) originadas da reprodução do macho parental exposto ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L), mantidos em meio embriônico ou (B) larvas diretamente expostas ao BPS (0,5 µg/L) após 96h pós-fertilização. **(C-F)** Desenvolvimento dos embriões/larvas (F1) após 96h em meio embriônico. (C) ausência de formação de somitos (D) não desprendimento da cauda (E) edema pericárdico (F) deformidade da coluna espinhal. Nas larvas (F1) não foram observados edema de saco vitelínico tanto no grupo controle (DMSO) como no grupo tratado (BPS). Nas larvas diretamente expostas não identificamos qualquer alteração de desenvolvimento tanto no grupo controle (DMSO) como no grupo tratado (BPS). Foram analisados os seguintes parâmetros de alteração de desenvolvimento: ausência da formação de somitos, não desprendimento da cauda, edema pericárdico, edema do

saco vitelínico e deformidade da coluna espinhal. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=100). (****) representa diferença significativa com p<0,0001. (NS) sem diferença significativa.

Quanto as taxas de sobrevivência, observa-se acentuada mortalidade entre a prole resultante de machos parentais expostos ao BPS ($p < 0,0001$) ao longo das 96 h de observação em relação ao grupo controle, com pico de mortalidade ocorrendo nas primeiras 48h (Fig 6A). A partir deste ponto, a mortalidade se manteve estável até o final do período de observação (96h), com os embriões/larvas atingindo apenas 32 % de sobrevivência em relação a 99% do grupo controle (Fig 6A). Os embriões/larvas diretamente expostos ao BPS não apresentaram alteração na mortalidade em relação ao grupo controle ao longo das 96h (Fig 6B).

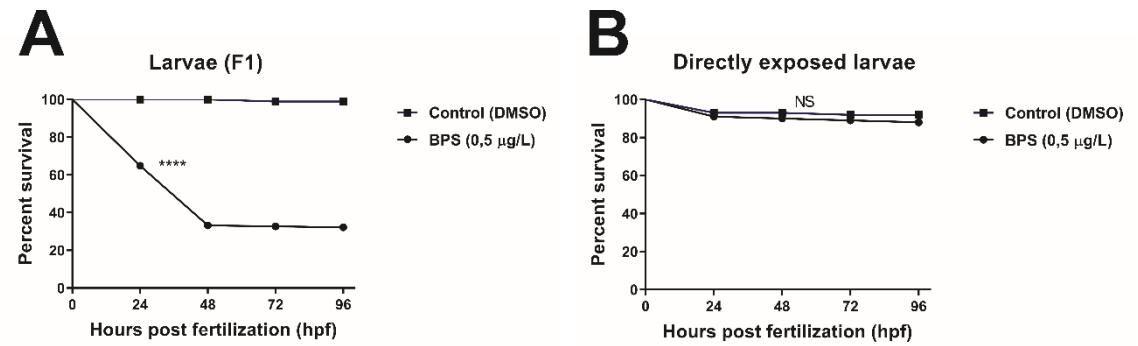


Fig. 6. Curva de sobrevivência dos embriões/larvas de zebrafish geração F1 e diretamente expostas. (A) Curva de sobrevivência dos embriões/larvas (F1) originados da reprodução do macho parental exposto ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L) mantidos em meio embriônico e (B) embriões/larvas diretamente expostos ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L) ao longo de 96h pós-fertilização. (****) representa diferença significativa com $p < 0,0001$. (NS) sem diferença significativa. Curva de Kaplan-Meier seguida por teste log-rank, n = 100 por grupo.

3.6 Análise de expressão gênica das larvas (F1) e larvas diretamente expostas ao BPS.

Avaliamos os níveis de mRNA dos genes relacionados ao desenvolvimento (*mstn1*, *vegta* e *wnt8*), estrógeno (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1*) e andrógeno (*hsd11β2*) nas larvas da geração F1 (Fig 7A) e larvas diretamente expostas ao BPS (Fig 7B). A exposição paterna ao BPS foi capaz de afetar a expressão gênica das larvas F1 em relação ao grupo controle (Fig 7A). Os transcritos primários de *mstn 1* e *vegta* e *hsd11β2* foram mais abundantes nas larvas resultantes da exposição paterna ao BPS em relação ao controle (Fig 7A). No entanto, os genes relacionados ao estrógeno não foram afetados (Fig 7A). As larvas diretamente expostas ao BPS estimularam todos os genes de desenvolvimento (*mstn1*, *vegta* e *wnt8*) e relacionados ao estrógeno (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1*) avaliados (Fig 7B).

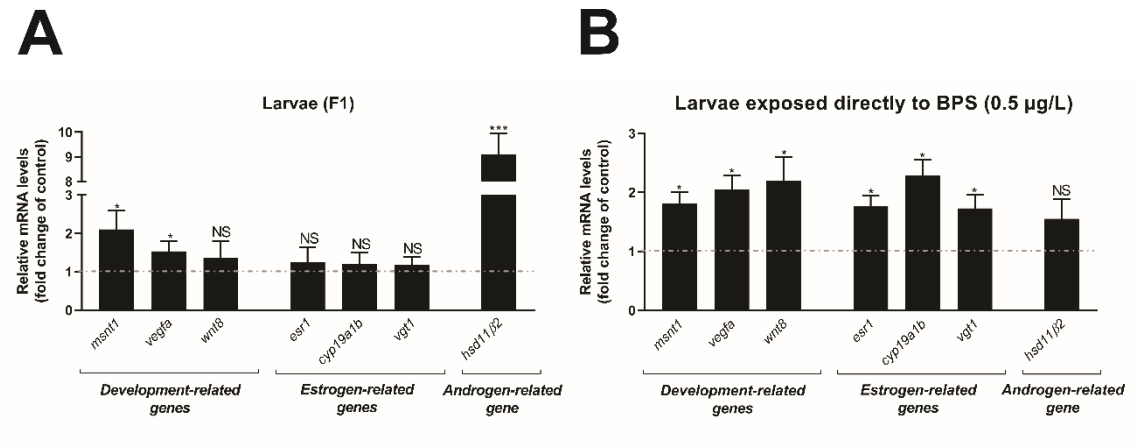


Fig. 7. Análise de expressão gênica das larvas de zebrafish. Expressão relativa dos genes relacionados ao desenvolvimento (*mstn1*, *vegfa* e *wnt8*), estrógeno, (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1)* e andrógeno *(hsd11β2*) em larvas de zebrafish. (A) larvas (F1) originadas da reprodução do macho parental exposto ao BPS (0,5 µg/L) ou DMSO (controle) após 96h em meio embriônico (B) larvas diretamente expostas ao DMSO (controle) ou BPS (0,5 µg/L) por 96h pós-fertilização. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β- actina) e expressos relativos ao grupo controle (DMSO). Os dados estão apresentados com a média ± erro padrão (n= 6 pools de 10 embriões por grupo) e como fold induction do controle (DMSO) representado pela linha tracejada. (*) representa diferença significativa com $p < 0,05$. (NS) sem diferença significativa.

4. Discussão

O BPS é um contaminante ambiental de preocupação emergente, capaz de desregular a produção de hormônios sexuais como a testosterona e o estradiol em diversos organismos modelos (Feng *et al*., 2016; Ullah *et al*., 2018; Campen *et al*., 2018; Ullah *et al*., 2021; Wang *et al*., 2023). Em machos de zebrafish, foi relatado que o BPS promove aumento de 17-β estradiol concomitantemente a redução de testosterona (Ji *et al*., 2013; Naderi *et al*., 2014; Park *et al*., 2022) e 11-KT (Park *et al*., 2022).

O 11-KT é um dos principais hormônios androgênicos em peixes teleósteos (De Waal *et al* 2008; Skaar *et al*., 2011; Crespo *et al*., 2019). Nossos resultados mostraram que o BPS estimulou a concentração plasmática do 11-KT o que também se refletiu na liberação de 11-KT pelo meio de cultura. Aqui, relatamos efeito contrário ao BPA, descrito como repressor da produção de hormônios androgênicos, como a testosterona (Mandich *et al*., 2007; Chen *et al*., 2019; Zhao *et al*., 2017; Lee *et al*., 2021. Zhu *et al*., 2022) e o 11-KT (Wang *et al*., 2019; Forner-Piquer *et al*., 2019; Gonzalez *et al*., 2021) em diferentes espécies de peixes teleósteos. Park e colaboradores (2022) encontraram redução do 11-KT com exposição de machos de zebrafish ao BPS à 40 µg/mL e 200 µg/mL por 21 dias. No entanto, são concentrações que excedem em

mais de mil vezes a concentração do presente estudo. Os desreguladores endócrinos podem apresentar efeitos opostos a depender da dose utilizada (Vandenberg *et al*., 2014), em uma relação não monotônica do tipo hormética, na qual doses mais baixas estimulam um determinado efeito biológico, enquanto doses mais altas o reprimem (Calabrese *et al*., 2007; Vandenberg *et al*., 2014). Esta relação pode justificar a divergência na resposta entre os dois trabalhos quanto ao impacto do BPS sobre o 11-KT.

Igualmente, o 11-KT mostrou-se elevado nos testículos após o tratamento *in vivo* com BPS e subsequente cultivo *ex vivo* em meio de cultura (L-15 apenas). O Fsh é bem estabelecido como estimulante do 11-KT *ex vivo* em zebrafish (Skaar *et al*., 2011; Fallah *et al*., 2021). No entanto, a aplicação de Fsh em meio de cultura após o tratamento *in vivo* com BPS não potencializou significativamente a produção de 11-KT. É possível que um mecanismo de feedback negativo tenha ocorrido para evitar a produção excessiva de 11-KT. Até onde sabemos, este foi o primeiro trabalho a demonstrar que o BPS pode estimular o 11-KT.

O 11-KT é indutor da espermatogênese em peixes (Miura *et al* 1991; Cavaco *et al*., 1998; Miura & Miura*.,* 2003; De Waal *et al* 2008; Zheng *et al* 2020), promovendo diferenciação nos estágios finais do processo espermatogênico, estimulando os cistos meióticos e pós-meióticos (Cavaco *et al*., 1998; Miura & Miura*.,* 2003; Leal *et al* 2009). Alinhada à elevação do 11-KT observada no tratamento com o BPS, a análise da proporção de área dos cistos espermatogênicos mostrou que o BPS estimulou os cistos meióticos (espermatócitos; Spc) e pós-meióticos (espermátides; Spt), além de aumentar o número de espermatozoides (Spz). Os resultados da análise de expressão gênica refletem este ambiente pró-diferenciação, evidenciado pelo aumento da expressão do gene marcador de prófase da meiose (*sycp3l*) (Saito *et al* 2011; Tovo-Neto *et al*., 2020; Dai *et al*., 2021), do gene da enzima indicadora de atividade esteroidogênica (*star*) (Yu *et al* 2014; Bhat *et al*., 2021), juntamente com a elevação expressiva nos níveis de mRNA da enzima crucial para a produção de andrógenos (*cyp17a1*) (Porubek *et al*., 2013; Bacila *et al*., 2021). Além disso, a queda dos cistos de espermatogônias indiferenciadas (A_{und}), indicam que o BPS induziu repressão dos cistos em estágio inicial (espermatogônias tronco) da espermatogênese em favor do estímulo dos estágios finais (Spc, Spt e Spz).

Em mamíferos (Jin *et al*., 2013, Liu *et al*., 2013; Xie *et al*., 2016; Jenardhanan *et al*., 2016; Liu *et al* 2021; Lo Nostro *et al*., 2023) e peixes (Sohoni *et al*., 2001; Lahnsteiner *et al*., 2005; Faheem & Bhandari *et al*., 2021 Batista-Silva *et al*., 2022, Mostari *et al*., 2022; Reis *et*

al., 2022, Gonzalez-Rojo *et al*., 2019), o BPA é descrito como prejudicial a espermatogênese, alterando a proporção de cistos de células diferenciadas, como espermatócitos e espermátides, e reduzindo a produção espermática. Trabalhos em mamíferos indicam que o BPS também é repressor da espermatogênese, reduzindo espermatócitos, espermátides (Ullah *et al.,* 2021) e a produção de espermatozoides (Ullah *et al*., 2017, Shi *et al*., 2017, Nawaz *et al*., 2021; Darghouthi *et al*., 2022). No entanto, há carência de estudos que tenham mensurado seus impactos na espermatogênese de peixes. Hao e colaboradores (2022) encontraram redução da porcentagem de espermatozoides em zebrafish após tratamento com BPS. No entanto, os zebrafish foram expostos à 1 e 100 µg/L de BPS a partir de 3h hpf por 120 dias. As diferentes condições experimentais, como a expressiva discrepância da janela de exposição (iniciada no estágio de embrião) podem justificar a resposta contrária na produção dos espermatozoides em relação ao presente trabalho.

Visto que a espermatogênese compreende uma série de modificações epigenéticas essências para o funcionamento da meiose e que podem influenciar não apenas no processo espermatogênico, mas também na informação transmitida para a descendência durante a fertilização (Hazzouri *et al*., 2000; Champroux *et al*., 2018; Gonzalez-Rojo *et al* 2019). No presente estudo, encontramos que o BPS estimulou uma série de genes envolvidos em regulação epigenética, elevando os níveis de mRNA dos genes envolvidos nos processos de metilação do DNA (*dnmt5*), desmetilação do DNA (*tet1*), acetilação de histonas (*kat6a*) e desacetilação de histonas (*hdac4*), não encontrando interferência na expressão gênica dos processos de metilação/desmetilação de histonas. É possível que o aumento conjunto da expressão de *dnmt5*/*tet1* e *kat6a*/*hdac4* seja um mecanismo de balanço para evitar um excesso de metilação/desmetilação do DNA e acetilação/desacetilação de histonas, respectivamente, como estratégia para manter a estabilidade do genoma.

Dado que a exposição com BPS modulou genes de regulação epigenética, e que a regulação da transcrição genica executada por esses processos de metilação e acetilação podem alterar o perfil de transcrição gênica ao longo do processo espermatogênico, e desta forma, afetar os RNAs presentes nos espermatozoides, RNAs que podem ser necessários para a qualidade dos espermatozoides (Wang *et al*., 2004; Miller & Ostemeier 2006, Schagdarsurengin & Steger, 2016). Além disso, tendo em vista que desreguladores endócrinos, como os bisfenóis, podem comprometer a produção e cinética dos espermatozoides em diferentes modelos (Hatef *et al*., 2013, Chen *et al*., 2017; Carnevalli *et al*., 2018; Silveira *et al*., 2019; Shaliutina *et al*., 2021; Nguyen *et al*., 2022; Torres-Badia *et al*., 2023; Sahu *et al*., 2023). Aqui, avaliamos a

qualidade espermática através da produção, motilidade e parâmetros de movimentos dos espermatozoides.

Em zebrafish, a exposição ao BPA reduz a produção espermática (Chen *et al*., 2017; Mostari *et al*., 2022, Reis *et al*., 2022) a motilidade e parâmetros de velocidade dos espermatozoides (Chen *et al*., 2017; Silveira *et al*., 2019; Mostari *et al*., 2022). Os resultados da análise da qualidade espermática através do software ImageJ/CASA, mostraram que a exposição ao BPS aumentou substancialmente ($p<0,01$) o número de espermatozoides no campo de análise em relação ao grupo controle. Achado que está de acordo com o dado obtido pela quantificação do número relativo de espermatozoides na análise histológica. Portanto, mostramos por diferentes metodologias que o BPS foi capaz de desregular a produção de espermatozoides. Além disso, o BPS reduziu a motilidade dos espermatozoides, dada pela proporção de espermatozoides móveis no total (Chen *et al*., 2017). Os dados indicam que a desregulação endócrina causada pelo BPS, apesar de ter aumentado a produção espermática, impactou negativamente um dos principais parâmetros para avaliação da qualidade espermática, a motilidade (Rurangwa *et al*., 2004; Awad *et al*., 2011; Hidayatullah *et al*., 2021). A queda da motilidade encontrada no presente trabalho, é consistente com a redução de motilidade vista para ratos (Sahu *et al*., 2023) e camundongos (Shi *et al*., 2017) após tratamento com o BPS. Ademais, a exposição com o BPS afetou outro parâmetro da cinética dos espermatozoides, aumentando a velocidade curvilinear (VCL,µm/s), dada pela velocidade ponto a ponto (distância total percorrida) por segundo (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). A alteração da cinética dos espermatozoides pode interferir na capacidade do esperma em encontrar e fertilizar o oócito (Gallego *et al*., 2017; Castro *et al*., 2024). Os primordiais determinantes da fertilidade masculina são a motilidade e a velocidade dos espermatozoides uma vez liberados no ambiente (Linhart *et al*., 2008; Carnevali *et al*., 2018; Waller *et a*l., 2019), sendo assim, o presente trabalho fornece evidências de que o BPS pode ser capaz de perturbar a fertilidade de machos de zebrafish pela deterioração da qualidade do esperma. Até onde sabemos, este foi o primeiro trabalho a avaliar os efeitos do BPS na qualidade espermática através da cinética dos espermatozoides em peixes.

Para determinar a viabilidade da prole decorrente de possíveis alterações da informação paterna ocasionadas pela exposição ao BPS, examinamos a taxa de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência dos embriões/larvas (F1) durante 96 h pós-fertilização. Houve acentuado atraso nas taxas de eclosão, notável aumento de malformações como ausência de formação de somitos e não desprendimento da cauda, além de mortalidade drasticamente elevada, em relação ao

grupo controle. Os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes são conhecidos como a janela mais suscetíveis aos efeitos de contaminantes ambientais (como os EDCs), mesmo em concentrações baixas. Por isso, têm sido frequentemente utilizados como ponto de partida para avaliações de toxicidade (Naderi *et al*., 2014; Gyimah *et al*, 2021). A suscetibilidade a estressores ambientais é ampliada em períodos do desenvolvimento onde a homeostase das vias fisiológicas pode ser interrompida, culminando em distúrbios fenotípicos que podem perdurar pelo curso da vida do organismo (Hanson & Gluckman, 2014; Gyimah *et al*., 2021). No entanto, a exposição direta de embriões/larvas com BPS por 4 dias, não resultou em diferença significativa na eclosão, alteração no desenvolvimento ou na sobrevivência ao longo do período avaliado, em comparação ao respectivo grupo controle. Trabalhos prévios encontraram alterações morfológicas em embriões/larvas de zebrafish após exposição ao BPS (Moreman *et al*., 2017; Qiu *et al*., 2018; Gyimah *et al*., 2021; Qiu *et al*., 2021). Porém, observando efeitos apenas com altas doses distantes de qualquer relevância ambiental (Yamazaki *et al*., 2015; Qiu *et al*., 2019, Moreman *et al*., 2017).

Os dados indicam que em exposição direta à concentração ambientalmente relevante, o BPS tem pouca capacidade de perturbar parâmetros de desenvolvimento dos embriões. No mais, diferenças nas taxas de sobrevivência de embriões/larvas diretamente expostos ao BPS não têm sido relatadas. Juntos, os dados mostram que expor o macho parental ao BPS tem consequências de maior gravidade à prole em relação a expor diretamente os embriões/larvas ao BPS. Sugerimos que possíveis impactos epigenéticos no desenvolvimento dos gametas possam estar subjacentes as alterações observadas na prole (mortalidade dos embriões, redução da taxa de eclosão e malformações). Hipótese embasada pela capacidade do BPS em ter modulado os genes *dnmt5*, *tet1*, *kat6a* e *hdac4*, envolvidos em diferentes processos de regulação epigenética. Alguns trabalhos propõem que modificações nos níveis de mRNA do esperma, como consequência de alterações epigenéticas, podem ser responsáveis por malformações na prole após exposição do zebrafish paternal ao BPA (Lombó *et al*., 2019; Gonzalez Rojo *et al* 2019, Lombó & Herráez *et al*., 2021). Hao e colaboradores 2022, identificaram modificações na metilação dos testículos após exposição do macho parental de zebrafish ao BPS. No entanto, os possíveis efeitos desta modificação epigenética na prole foram obscurecidos por conta de a reprodução ter sido realizada com fêmeas também tratadas.

Além disso, avaliamos nas larvas F1 e diretamente expostas ao BPS a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento, as vias estrogênicas e androgênica. Os genes relacionados ao desenvolvimento *vegfa* e *wnt8a* são conhecidos por desempenhar papel crucial

em uma diversidade de processos, incluindo o desenvolvimento embrionário (Gyima *et al* 2021). O *vegfa* é indispensável para o desenvolvimento vascular (Zhu *et al*., 2017; Chen *et al*., 2020). O *wnt8* é necessário para a formação do eixo dorsal (Lekven *et al*., 2005; Hino *et al*., 2018). Já o *mstn1(Miostatina*), também conhecido como GDF-8, é um membro da superfamília TGF-β que em peixes teleósteos é expressa em uma série de tecidos como músculos, cérebro, olhos, brânquias, intestino, ovários e testículos (Rodgers *et al*., 2001; Xie *et al*., 2019). Neste estudo, demonstramos que o tratamento do macho parental com BPS interferiu na expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento *vegfa* e *mstn1* nas larvas F1, em correlação com alterações de desenvolvimento e queda de sobrevivência. Todavia, apesar de a exposição direta das larvas ao BPS não ter afetado a eclosão, o desenvolvimento e a sobrevivência, impactou a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento. É possível que os níveis de mRNA dos genes *mstn1*, *vegfa* e *wnt8* não reflitam diretamente a morfologia, mas também sejam decorrentes de outras condições não identificadas relacionadas ao tratamento. Além disso, a manifestação visível de alterações morfológica nos embriões pode ser decorrente do desbalanço destes genes com uma série de outro genes que não foram avaliados.

EDCs podem perturbar o desenvolvimento sexual do zebrafish, promovendo feminilização ou masculinização (Santos *et al*., 2017), evidências indicam que o BPA induz feminilização durante o desenvolvimento das gônadas de diversos organismos (Crain *et al*., 2007). De modo similar, o BPS apresentou viés para a feminilização durante o desenvolvimento embrionário do zebrafish (Naderi *et al*., 2014). Dito isto, também quantificamos a expressão de genes utilizados para estimar atividade estrogênica nas larvas: receptor de estrógeno (*esr1*), Aromatase B (*cyp19a1b*) e vitelogenina (*vgt1*) (Schiller *et al*., 2014; Guo *et al*., 2017). Nenhum destes genes foi modulado na F1, sugerindo baixa capacidade do BPS em promover atividade estrogênica de uma geração a outra, quando atuando apenas na informação paterna. Destacamos a não alteração dos genes e *cyp19a1b* e *vgt1*, amplamente utilizado em peixes machos como biomarcadores para exposição a compostos estrogênicos e xenoestrogênicos. (Sumpter & Jobling, 1995; Brion *et al*., 2012; Chow *et al*., 2013, Schiller *et al*., 2014; Cano-Nicolau *et al*., 2016). No entanto, ocorreu forte estímulo da expressão do gene *hsd11b2*, envolvido na síntese de andrógenos, como a produção de 11-KT (Baker *et al*., 2010, Feswick *et al*., 2014; Tovo-Neto *et al*., 2020; Fang *et al*., 2022). Sugerindo efeito androgênico nas larvas F1. Contudo, maiores análises são necessárias para averiguar esta hipótese.

Durante o desenvolvimento embrionário, mesmo em concentrações baixas, hormônios endógenos (como hormônios esteroidais) exercem papéis cruciais durante a diferenciação

sexual (Naderi *et al*., 2014). Estudos prévios mostraram que a exposição direta ao BPS durante o período de desenvolvimento embrionário do zebrafish apresenta potencial efeito estrogênico, seja por desbalanço hormonal, elevando 17β-estradiol e vitellogenin (VTG), concomitantemente a redução de testosterona (Naderi *et al*., 2014), ou induzindo atividade estrogênica em zebrafish transgênico responsivo ao estrógeno Tg (ERE: Gal4ff) (UAS: GFP) (Moreman *et al*., 2017). Aqui, os embriões diretamente expostos ao BPS estimularam todos os genes relacionados ao estrógeno avaliados (*esr1, cyp19a1b* e *vgt1*), e não modularam o gene *hsd11b2.* Juntos, os dados indicam que a exposição direta dos embriões/larvas ao BPS estimula a atividade estrogênica, ao contrário do observado nas larvas F1, oriundas do tratamento do macho parental exposto ao BPS.

Até onde sabemos, pela primeira vez, os impactos da exposição ao BPS na informação paterna sobre a taxa de sobrevivência, eclosão, desenvolvimento e expressão gênica dos embriões/larvas (F1) em peixes foi demonstrado. Previamente, apenas alterações no desenvolvimento dos embriões/larvas resultantes do cruzamento de machos e fêmeas tratados com BPS haviam sido reportados (Ji *et al*., 2013; Naderi *et al*., 2014; Wei *et al* 2018; Hao *et al*., 2022). Nosso trabalho possibilita uma visão mais clara das consequências do BPS na informação paterna pós-fertilização sobre a viabilidade dos embriões. Questão de suma importância, dado que o gameta masculino não pode mais ser visto apenas como um mero vetor do genoma paterno (Miller & Ostermeier, 2006).

Conclusão

De forma inédita, um efeito androgênico do BPS em peixes foi relatado, elevando o 11-KT e estimulando a produção de espermatozoides, em oposição aos impactos anteriores descritos para o BPS na literatura. No entanto, este impacto não se refletiu na qualidade espermática e na viabilidade dos embriões, que foram prejudicados. Efeitos estrogênicos não foram identificados nos adultos expostos e nas larvas F1. Entretanto, as larvas diretamente expostas apresentaram aumento da expressão de genes marcadores de atividade estrogênica. Por fim, este estudo encontrou efeito intergeracional do BPS na informação paterna, evidenciando que expor o macho parental ao BPS teve maior influência no desenvolvimento e sobrevivência dos embriões em relação ao observado na exposição direta ao BPS. Os resultados sugerem que o potencial do BPS como desregulador endócrino não deve ser minimizado, ampliando o debate sobre a viabilidade do BPS como alternativo ao uso do BPA.

Referências

Askarniya, Z., Rayaroth, M. P., Sun, X., Wang, Z., & Boczkaj, G. (2023). Degradation of bisphenol S–a contaminant of emerging concern-by synergistic ozone and percarbonate based AOP. *Water Resources and Industry*, 29, 100208.

Awad, M. M. (2011). Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal reproduction science*, *123*(3-4), 157-162.

Babiak, I., Marschhäuser, V., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Eggen, B., & Babiak, J. (2012). Effects of extender, storage and sperm-to-egg ratio on cryopreservation success of A tlantic cod (G adus morhua L.) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(6), 941-947.

Bacila, I., Cunliffe, V. T., & Krone, N. P. (2021). Interrenal development and function in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *535*, 111372.

Batista-Silva, H., Rodrigues, K., de Moura, K. R. S., Elie, N., Van Der Kraak, G., Delalande, C., & Silva, F. R. M. B. (2022). In vivo and in vitro short-term bisphenol A exposures disrupt testicular energy metabolism and negatively impact spermatogenesis in zebrafish. *Reproductive Toxicology*, 107, 10-21.

Bhat, I. A., Dar, J. Y., Ahmad, I., Mir, I. N., Bhat, H., Bhat, R. A., ... & Sharma, R. (2021). Testicular development and spermatogenesis in fish: Insights into molecular aspects and regulation of gene expression by different exogenous factors. *Reviews in Aquaculture*, *13*(4), 2142-2168.

Baker, M. (2010). 11 [beta]-hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 evolved from an ancestral 17 [beta]-hydroxysteroid dehydrogenase-type 2. *Nature Precedings*, 1-1.

Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Tong, S. K., Chung, B. C., & Kah, O. (2012). Brain aromatase (Cyp19a1b) is a highly sensitive gene to estrogens and xeno-estrogens. *In Endocrine Disruptors* (p. NC).

Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., ... & Mattson, M. P. (2007). Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and applied pharmacology*, *222*(1), 122-128.

Cambien, G., Dupuis, A., Guihenneuc, J., Bauwens, M., Belmouaz, M., & Ayraud-Thevenot, S. (2023). Endocrine disruptors in dialysis therapies: A literature review. *Environment International*, 178, 108100.

Campen, K. A., Lavallee, M., & Combelles, C. M. (2018). The impact of bisphenol S on bovine granulosa and theca cells. *Reproduction in domestic animals*, *53*(2), 450-457.

Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T. D., Kah, O., & Coumailleau, P. (2016). Estrogenic effects of several BPA analogs in the developing zebrafish brain. *Frontiers in neuroscience*, 10, 187322.

Carnevali, O., Santangeli, S., Forner-Piquer, I., Basili, D., & Maradonna, F. (2018). Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish gametes?. *Fish physiology and biochemistry*, *44*, 1561-1576.

Castro, J.D.S., Santos, F. B. P., da Costa, J. C., Heinrichs-Caldas, W., & Val, A. L. (2024). In vivo exposure to high temperature compromises quality of the sperm in Colossoma macropomum. *Animal Reproduction Science*, 262, 107412.

Cavaco, J. E. B., Vilrokx, C., Trudeau, V. L., Schulz, R. W., & Goos, H. J. (1998). Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (Clarias gariepinus). American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 275(6), R1793-R1802.

Česen, M., Ahel, M., Terzić, S., Heath, D. J., & Heath, E. (2019). The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. *Science of the total environment*, *650*, 2446-2453.

Champroux, A., Cocquet, J., Henry-Berger, J., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2018). A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: paternal epigenetic and transgenerational inheritance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*, 50.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity - a review. *Environmental science & technology*, *50*(11), 5438-5453.

Chen, J., Saili, K. S., Liu, Y., Li, L., Zhao, Y., Jia, Y., ... & Huang, C. (2017). Developmental bisphenol A exposure impairs sperm function and reproduction in zebrafish. *Chemosphere*, *169*, 262-270.

Chen, L., Hu, C., Guo, Y., Shi, Q., & Zhou, B. (2019). TiO2 nanoparticles and BPA are combined to impair the development of offspring zebrafish after parental coexposure. *Chemosphere*, *217*, 732-741.

Chen, G., Wang, L., Li, W., Zhang, Q., & Hu, T. (2020). Nodularin induced oxidative stress contributes to developmental toxicity in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 194, 110444.

Chow, W. S., Chan, W. K. L., & Chan, K. M. (2013). Toxicity assessment and vitellogenin expression in zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae acutely exposed to bisphenol A, endosulfan, heptachlor, methoxychlor and tetrabromobisphenol A. *Journal of Applied Toxicology*, *33*(7), 670-678.

Costa, D. F., de Oliveira Ribeiro, A., Ricci, J. M. B., da Silva Rodrigues, M., de Oliveira, M. A., da Rosa, I. F., ... & Nóbrega, R. H. (2024). A83-01 and DMH1 effects in the zebrafish spermatogonial niche: Unraveling the roles of TGF-β and BMP signaling in the Fsh-mediated spermatogonial fate. *Gene*, *897*, 148082.

Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette Jr, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive toxicology*, *24*(2), 225-239.

Crespo, D., Assis, L. H., Van De Kant, H. J., De Waard, S., Safian, D., Lemos, M. S., ... & Schulz, R. W. (2019). Endocrine and local signaling interact to regulate spermatogenesis in zebrafish: follicle-stimulating hormone, retinoic acid and androgens. *Development*, 146(21), dev178665.

Dai, W., He, Q. Z., Zhu, B. Q., & Zeng, H. C. (2021). Oxidative stress-mediated apoptosis is involved in bisphenol S-induced reproductive toxicity in male C57BL/6 mice. *Journal of Applied Toxicology*, *41*(11), 1839-1851.

Darghouthi, M., Rezg, R., Boughmadi, O., & Mornagui, B. (2022). Low-dose bisphenol S exposure induces hypospermatogenesis and mitochondrial dysfunction in rats: A possible implication of StAR protein. *Reproductive Toxicology*, 107, 104-111.

De Waal, P. P., Wang, D. S., Nijenhuis, W. A., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2008). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (Danio rerio) testis. *Reproduction*, *136*(2), 225.

Faheem, M., & Bhandari, R. K. (2021). Detrimental effects of bisphenol compounds on physiology and reproduction in fish: a literature review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *81*, 103497.

Fallah, H. P., Rodrigues, M. S., Zanardini, M., Nóbrega, R. H., & Habibi, H. R. (2021). Effects of gonadotropin-inhibitory hormone on early and late stages of spermatogenesis in ex-vivo culture of zebrafish testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *520*, 111087.

Fang, Z., Gao, Y., Wu, X., Xu, X., Sarmah, A. K., Bolan, N., ... & Wang, H. (2020). A critical review on remediation of bisphenol S (BPS) contaminated water: Efficacy and mechanisms. *Critical reviews in environmental science and technology*, *50*(5), 476-522.

Fang, Z., Li, X., Wang, Y., Lu, W., Hou, J., & Cheng, J. (2022). Steroidogenic Effects of Salinity Change on the Hypothalamus–Pituitary–Gonad (HPG) Axis of Male Chinese Sea Bass (Lateolabrax maculatus). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10905.

Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., & Shao, B. (2016). Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 147, 9-19.

Feswick, A., Ings, J. S., Doyle, M. A., Bosker, T., Munkittrick, K. R., & Martyniuk, C. J. (2014). Transcriptomics profiling and steroid production in mummichog (Fundulus heteroclitus) testes after treatment with 5α-dihydrotestosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 203, 106-119.

Forner-Piquer, I., Fakriadis, I., Mylonas, C. C., Piscitelli, F., Di Marzo, V., Maradonna, F., ... & Carnevali, O. (2019). Effects of dietary bisphenol A on the reproductive function of gilthead sea bream (Sparus aurata) testes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5003.

Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Smułek, W., & Grześkowiak, T. (2020). Removal of bisphenol A and its potential substitutes by biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *191*, 1100-1110.

Fu, Z., Jin, H., Mao, W., & Hu, Z. (2024). Conjugated bisphenol S metabolites in human serum and whole blood. *Chemosphere*, *357*, 142082.

Gallego, V., Cavalcante, S. S., Fujimoto, R. Y., Carneiro, P. C. F., Azevedo, H. C., & Maria, A. N. (2017). Fish sperm subpopulations: changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (Colossoma macropomum). *Theriogenology*, 87, 16-24.

García-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R. H., de Waal, P. P., van Dijk, W., Hemrika, W., ... & Schulz, R. W. (2010). Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology*, *151*(5), 2349-2360.

González-Rojo, S., Lombó, M., Fernández-Díez, C., & Herráez, M. P. (2019). Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, *248*, 368-379.

Gonzalez, J. A., Histed, A. R., Nowak, E., Lange, D., Craig, S. E., Parker, C. G., ... & Rhodes, J. S. (2021). Impact of bisphenol-A and synthetic estradiol on brain, behavior, gonads and sex hormones in a sexually labile coral reef fish. *Hormones and Behavior*, *136*, 105043.

González-Rubio, S., Ballesteros-Gómez, A., Asimakopoulos, A. G., & Jaspers, V. L. (2021). A review on contaminants of emerging concern in European raptors (2002− 2020). *Science of The Total Environment*, 760, 143337.

Guo, D., Wang, Y., Qian, Y., Chen, C., Jiao, B., Cai, L., & Wang, Q. (2017). Joint acute and endocrine disruptive toxicities of malathion, cypermethrin and prochloraz to embryo-larval zebrafish, Danio rerio. *Chemosphere*, *166*, 63-71.

Gyimah, E., Xu, H., Dong, X., Qiu, X., Zhang, Z., Bu, Y., & Akoto, O. (2021). Developmental neurotoxicity of low concentrations of bisphenol A and S exposure in zebrafish. *Chemosphere*, 262, 128045.

Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. (2014). Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?. *Physiological reviews*, 94(4), 1027-1076.

Hanson, M. A., & Skinner, M. K. (2016). Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental epigenetics*, *2*(1), dvw002.

Hao, L., Ru, S., Qin, J., Wang, W., Zhang, J., Wei, S., ... & Zhang, X. (2022). Transgenerational effects of parental bisphenol S exposure on zebrafish (Danio rerio) reproduction. *Food and Chemical Toxicology*, 165, 113142.

Hatef, A., Alavi, S. M. H., Golshan, M., & Linhart, O. (2013). Toxicity of environmental contaminants to fish spermatozoa function in vitro—A review. *Aquatic toxicology*, *140*, 134-144.

Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A. K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., ... & Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *European journal of cell biology*, *79*(12), 950-960.

Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., & Žegura, B. (2019). Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Science of the total environment*, *687*, 267-276.

Herráez, M. P., Ausió, J., Devaux, A., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C., Bony, S., ... & Robles, V. (2017). Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. *Aquaculture*, *472*, 45-59.

Hidayatullah, P., Mengko, T. L., Munir, R., & Barlian, A. (2021). Bull sperm tracking and machine learning-based motility classification. *IEEE Access*, *9*, 61159-61170.

Hino, H., Nakanishi, A., Seki, R., Aoki, T., Yamaha, E., Kawahara, A., ... & Hibi, M. (2018). Roles of maternal wnt8a transcripts in axis formation in zebrafish. *Developmental Biology*, 434(1), 96-107.

Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., & Mathur, P. P. (2016). Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 59, pp. 126-140). *Academic Press*.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, *47*(15), 8793-8800.

Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of biomedical research*, *27*(2), 135.

Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews genetics*, *8*(4), 253-262.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, Salmo trutta f. fario. *Aquatic Toxicology*, *75*(3), 213-224.

Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2009a). Histological and stereological evaluation of zebrafish (Danio rerio) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of reproduction*, *81*(1), 177-187.

Leal, M. C., de Waal, P. P., García-López, Á., Chen, S. X., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2009b). Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo. *General and comparative endocrinology*, *162*(2), 134-138.

Lee, J., Moon, K. W., & Ji, K. (2021). Systematic review of exposure to bisphenol A alternatives and its effects on reproduction and thyroid endocrine system in zebrafish. *Applied Sciences*, *11*(4), 1837.

Lekven, A. C., Thorpe, C. J., Waxman, J. S., & Moon, R. T. (2001). Zebrafish wnt8 encodes two wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Developmental cell*, *1*(1), 103-114.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H. B., ... & Kannan, K. (2012). Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental science & technology*, *46*(12), 6860-6866.

Linhart, O., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., & Cosson, J. (2008). Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (Cyprinus carpio). *Journal of Applied Ichthyology*, *24*(4), 386-392.

Liu, C., Deng, J., Yu, L., Ramesh, M., & Zhou, B. (2010). Endocrine disruption and reproductive impairment in zebrafish by exposure to 8: 2 fluorotelomer alcohol. *Aquatic Toxicology*, *96*(1), 70-76.

Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., ... & Zhou, Z. (2013). Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell death & disease*, *4*(6), e676-e676.

Liu, X., Wang, Z., & Liu, F. (2021). Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice. *Chemosphere*, *262*, 127880.

Lo Nostro, F. L; Costa, D. F; Nóbrega, R. H; Da Cuña, R (2023). EDCs: focus on male fish reproductive alterations. *Environmental Contaminants And Endocrine Health*, [S.L.], p. 269-281.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., & Herráez, M. P. (2019). Genetic and epigenetic alterations induced by bisphenol A exposure during different periods of spermatogenesis: from spermatozoa to the progeny. *Scientific Reports*, *9*(1), 18029.

Lombó, M., & Herráez, M. P. (2021). Paternal inheritance of bisphenol A cardiotoxic effects: the implications of sperm epigenome. *International journal of molecular sciences*, *22*(4), 2125.

Ma, Y., Han, J., Guo, Y., Lam, P. K., Wu, R. S., Giesy, J. P., ... & Zhou, B. (2012). Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in in vivo assay in zebrafish by 2, 4-dichlorophenol. *Aquatic toxicology*, *106*, 173-181.

Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., ... & Vigano, L. (2007). In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *General and comparative endocrinology*, *153*(1-3), 15-24.

McBirney, M., King, S. E., Pappalardo, M., Houser, E., Unkefer, M., Nilsson, E., ... & Skinner, M. K. (2017). Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. *PloS one*, *12*(9), e0184306.

Miller, D., & Ostermeier, G. C. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human reproduction update*, *12*(6), 757-767.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (Anguilla japonica). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(13), 5774-5778.

Miura, T., & Miura, C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish physiology and biochemistry*, *28*, 181-186.

Molangiri, A., Varma, S., Satyavani, M., Kambham, S., Duttaroy, A. K., & Basak, S. (2022). Prenatal exposure to bisphenol S and bisphenol A differentially affects male reproductive system in the adult offspring. *Food and Chemical Toxicology*, *167*, 113292.

Morais, R. D. V. S., Nóbrega, R. H., Gómez-González, N. E., Schmidt, R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2013). Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (Danio rerio) testis. *Endocrinology*, *154*(11), 4365-4376.

Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., & Tyler, C. R. (2017). Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environmental science & technology*, *51*(21), 12796-12805.

Mornagui, B., Rezg, R., Repond, C., & Pellerin, L. (2019). Effects of bisphenol S, a major substitute of bisphenol A, on neurobehavioral responses and cerebral monocarboxylate transporters expression in mice. *Food and chemical toxicology*, *132*, 110670.

Mostari, M. H., Rahaman, M. M., Akhter, M. A., Ali, M. H., Sasanami, T., & Tokumoto, T. (2022). Transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues and sperm motility. *Reproductive Toxicology*, *109*, 31-38.

Mu, X., Huang, Y., Li, X., Lei, Y., Teng, M., Li, X., ... & Li, Y. (2018). Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. *Environmental science & technology*, *52*(5), 3222-3231.

Naderi, M., Wong, M. Y., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*, *148*, 195-203.

Nawaz, F., & Ara, C. (2021). Assessment of deleterious effects of bisphenol A (bpa) on steroidogenesis, sperm count, and spermatogenesis in a mammalian model. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, *31*(6).

Nguyen, M., Sabry, R., Davis, O. S., & Favetta, L. A. (2022). Effects of BPA, BPS, and BPF on oxidative stress and antioxidant enzyme expression in bovine oocytes and spermatozoa. *Genes*, *13*(1), 142.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., & Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PloS one*, *5*(9), e12808.

OECD, T. N. (2013). 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section*, *2*, 1-22.

Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., & Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, Anguilla japonica. *Biology of Reproduction*, *77*(6), 970-977.

Park, C. B., Kim, G. E., On, J., Pyo, H., Park, J. W., & Cho, S. H. (2022). Sex-specific effects of bisphenol S with tissue-specific responsiveness in adult zebrafish: The antiandrogenic and antiestrogenic effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *229*, 113102.

Perera, L., Li, Y., Coons, L. A., Houtman, R., van Beuningen, R., Goodwin, B., ... & Teng, C. T. (2017). Binding of bisphenol A, bisphenol AF, and bisphenol S on the androgen receptor: Coregulator recruitment and stimulation of potential interaction sites. *Toxicology in Vitro*, *44*, 287-302.

Pilsner, J. R., Parker, M., Sergeyev, O., & Suvorov, A. (2017). Spermatogenesis disruption by dioxins: Epigenetic reprograming and windows of susceptibility. *Reproductive toxicology*, *69*, 221-229.

Porubek, D. (2013). CYP17A1: a biochemistry, chemistry, and clinical review. *Current topics in medicinal chemistry*, *13*(12), 1364-1384.

Presunto, M., Mariana, M., Lorigo, M., & Cairrao, E. (2023). The effects of bisphenol A on human male infertility: A review of current epidemiological studies. *International journal of molecular sciences*, *24*(15), 12417.

Qiu, W., Shao, H., Lei, P., Zheng, C., Qiu, C., Yang, M., & Zheng, Y. (2018). Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during zebrafish early development. *Chemosphere*, *194*, 1-8.

Qiu, W., Zhan, H., Hu, J., Zhang, T., Xu, H., Wong, M., ... & Zheng, C. (2019). The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and environmental safety*, *173*, 192-202.

Qiu, W., Liu, S., Chen, H., Luo, S., Xiong, Y., Wang, X., ... & Wang, K. J. (2021). The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms. *Journal of hazardous materials*, *406*, 124303.

Reis, L. D. P. G., Lora-Benítez, A. J., Molina-López, A. M., Mora-Medina, R., Ayala-Soldado, N., & Moyano-Salvago, M. D. R. (2022). Evaluation of the toxicity of bisphenol A in reproduction and its effect on fertility and embryonic development in the Zebrafish (Danio rerio). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(2), 962.

Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., & Levine, M. A. (2001). Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: Oreochromis mossambicus and Morone chrysops. *Endocrinology*, *142*(4), 1412-1418.

Rodrigues, M. S., Fallah, H. P., Zanardini, M., Malafaia, G., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2021). Interaction between thyroid hormones and gonadotropin inhibitory hormone in ex vivo culture of zebrafish testis: An approach to study multifactorial control of spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *532*, 111331.

Rodrigues, M. S., Tovo-Neto, A., Rosa, I. F., Doretto, L. B., Fallah, H. P., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2022). Thyroid hormones deficiency impairs male germ cell development: a cross talk between hypothalamic-Pituitary-thyroid, and—gonadal axes in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 865948.

Ruan, T., Liang, D., Song, S., Song, M., Wang, H., & Jiang, G. (2015). Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere*, *124*, 150-155.

Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, *234*(1-4), 1-28.

Ryu, D. Y., Pang, W. K., Adegoke, E. O., Rahman, M. S., Park, Y. J., & Pang, M. G. (2023). Bisphenol-A disturbs hormonal levels and testis mitochondrial activity, reducing male fertility. *Human Reproduction Open*, *2023*(4), hoad044.

Sahu, A., & Verma, R. (2023). Bisphenol S dysregulates thyroid hormone homeostasis; Testicular survival, redox and metabolic status: Ameliorative actions of melatonin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *104*, 104300.

Saito, K., Siegfried, K. R., Nüsslein-Volhard, C., & Sakai, N. (2011). Isolation and cytogenetic characterization of zebrafish meiotic prophase I mutants. *Developmental Dynamics*, *240*(7), 1779-1792.

Salahinejad, A., Meuthen, D., Attaran, A., Niyogi, S., Chivers, D. P., & Ferrari, M. C. (2024). Maternal exposure to bisphenol S reduces anxiety and impairs collective antipredator behavior of male zebrafish (Danio rerio) offspring through dysregulation of their serotonergic system. *Aquatic Toxicology*, *267*, 106800.

Sanches, E. A., Marcos, R. M., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A., & Romagosa, E. (2013). Sperm motility parameters for Steindachneridion parahybae based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology*, *29*(5), 1114-1122.

Santos, D., Luzio, A., & Coimbra, A. M. (2017). Zebrafish sex differentiation and gonad development: a review on the impact of environmental factors. *Aquatic toxicology*, *191*, 141-163.

Schagdarsurengin, U., & Steger, K. (2016). Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nature Reviews Urology*, *13*(10), 584-595.

Schiller, V., Zhang, X., Hecker, M., Schäfers, C., Fischer, R., & Fenske, M. (2014). Species-specific considerations in using the fish embryo test as an alternative to identify endocrine disruption. *Aquatic toxicology*, *155*, 62-72.

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, *165*(3), 390-411.

Shaliutina, O., Materiienko, A., Shaliutina-Kolešová, A., & Gazo, I. (2021). Using fish spermatozoa in in vitro toxicity tests: A potential toxicology tool. *Aquaculture*, *539*, 736647.

Shi, M., Sekulovski, N., MacLean II, J. A., & Hayashi, K. (2017). Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. *Reproductive toxicology*, *73*, 280-291.

Silveira, C. R., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Soares, S. L., Anciuti, A. N., Kütter, M. T., & Martínez, P. E. (2019). Effects of Bisphenol A on redox balance in red blood and sperm cells and spermatic quality in zebrafish Danio rerio. *Ecotoxicology*, *28*, 913-922.

Skaar, K. S., Nobrega, R. H., Magaraki, A., Olsen, L. C., Schulz, R. W., & Male, R. (2011). Proteolytically activated, recombinant anti-Müllerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology*, *152*(9), 3527-3540.

Sohoni, P. C. R. T., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., ... & Sumpter, J. P. (2001). Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (Pimephales promelas). *Environmental science & technology*, *35*(14), 2917-2925.

Strazzullo, M., & Rosaria Matarazzo, M. (2017). Epigenetic effects of environmental chemicals on reproductive biology. *Current Drug Targets*, *18*(10), 1116-1124.

Sumpter, J. P., & Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental health perspectives*, *103*(suppl 7), 173-178.

Tian, S., Sun, W., Sun, X., Yue, Y., Jia, M., Huang, S., ... & Zhu, W. (2023). Intergenerational reproductive toxicity of parental exposure to prothioconazole and its metabolite on offspring and epigenetic regulation associated with DNA methylation in zebrafish. *Environment International*, *173*, 107830.

Torres-Badia, M., Martin-Hidalgo, D., Serrano, R., Garcia-Marin, L. J., & Bragado, M. J. (2023). Bisphenol S reduces pig spermatozoa motility through different intracellular pathways and mechanisms than its analog bisphenol A. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(11), 9598.

Tovo-Neto, A., Martinez, E. R., Melo, A. G., Doretto, L. B., Butzge, A. J., Rodrigues, M. S., ... & Nóbrega, R. H. (2020). Cortisol directly stimulates spermatogonial differentiation, meiosis, and spermiogenesis in zebrafish (Danio rerio) testicular explants. *Biomolecules*, *10*(3), 429.

Tumu, K., Vorst, K., & Curtzwiler, G. (2023). Endocrine modulating chemicals in food packaging: A review of phthalates and bisphenols. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *22*(2), 1337-1359.

Ullah, H., Ambreen, A., Ahsan, N., & Jahan, S. (2017). Bisphenol S induces oxidative stress and DNA damage in rat spermatozoa in vitro and disrupts daily sperm production in vivo. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *99*(5-6), 953-965.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., ... & Butt, M. A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, *209*, 508-516.

Ullah, H., Ullah, F., Rehman, O., Jahan, S., Afsar, T., Al-Disi, D., ... & Razak, S. (2021). Chronic exposure of bisphenol S (BPS) affect hypothalamic-pituitary-testicular activities in adult male rats: possible in estrogenic mode of action. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *26*, 1-11.

Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-response*, *12*(2), dose-response.

Vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., ... & Welshons, W. V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and industrial health*, *14*(1-2), 239-260.

Waller, E. J., Roberts, P., & Matson, P. (2019). Assessment of sperm motility, and its relationship with sperm function and fertility. *J Reprod Biotechnol Fertil*, *8*, 30-53.

Wang, H., Zhou, Z., Xu, M., Li, J., Xiao, J., Xu, Z. Y., & Sha, J. (2004). A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine*, *82*, 317-324.

Wang, Q., Yang, H., Yang, M., Yu, Y., Yan, M., Zhou, L., ... & Li, Y. (2019). Toxic effects of bisphenol A on goldfish gonad development and the possible pathway of BPA disturbance in female and male fish reproduction. *Chemosphere*, *221*, 235-245.

Wang, W., Ru, S., Wang, L., Wei, S., Zhang, J., Qin, J., ... & Zhang, X. (2020). Bisphenol S exposure alters behavioral parameters in adult zebrafish and offspring. *Science of The Total Environment*, *741*, 140448.

Wang, Y. X., Dai, W., Li, Y. Z., Wu, Z. Y., Kan, Y. Q., Zeng, H. C., & He, Q. Z. (2023). Bisphenol S induces oxidative stress-mediated impairment of testosterone synthesis by inhibiting the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *37*(3), e23273.

Wei, P., Zhao, F., Zhang, X., Liu, W., Jiang, G., Wang, H., & Ru, S. (2018). Transgenerational thyroid endocrine disruption induced by bisphenol S affects the early development of zebrafish offspring. *Environmental pollution*, *243*, 800-808.

Wilson-Leedy, J. G., & Ingermann, R. L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, *67*(3), 661-672.

Wu, P., Cai, Z., Jin, H., & Tang, Y. (2019). Adsorption mechanisms of five bisphenol analogues on PVC microplastics. Science of the Total Environment, 650, 671-678.

Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., & Wang, Y. (2016). Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget*, *7*(9), 10606.

Xie, S., Zhou, A., Feng, Y., Wang, Z., Fan, L., Zhang, Y., ... & Zou, J. (2019). Effects of fasting and re-feeding on mstn and mstnb genes expressions in Cranoglanis bouderius. *Gene*, *682*, 1-12.

Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P. K., Moon, H. B., ... & Kannan, K. (2015). Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and environmental safety*, *122*, 565-572.

Yang, T., Wang, L., Liu, Y., Huang, Z., He, H., Wang, X., ... & Ma, J. (2019). Comparative study on ferrate oxidation of BPS and BPAF: Kinetics, reaction mechanism, and the improvement on their biodegradability. *Water research*, *148*, 115-125.

Yu, X., Wu, L., Xie, L., Yang, S., Charkraborty, T., Shi, H., ... & Zhou, L. (2014). Characterization of two paralogous StAR genes in a teleost, Nile tilapia (Oreochromis niloticus). *Molecular and cellular endocrinology*, *392*(1-2), 152-162.

Zhao, F., Wei, P., Wang, J., Yu, M., Zhang, X., Tian, H., ... & Ru, S. (2017). Estrogenic effects associated with bisphenol a exposure in male zebrafish (Danio rerio) is associated with changes of endogenous 17β-estradiol and gene specific DNA methylation levels. *General and Comparative Endocrinology*, *252*, 27-35.

Zheng, Q., Xiao, H., Shi, H., Wang, T., Sun, L., Tao, W., ... & Wang, D. (2020). Loss of Cyp11c1 causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *Journal of Endocrinology*, *244*(3), 487-499.

Zhu, D., Fang, Y., Gao, K., Shen, J., Zhong, T. P., & Li, F. (2017). Vegfa impacts early myocardium development in zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 444.

Zhu, L., Wang, M., Fu, S., Li, K., Liu, J., & Wang, Z. (2022). BPA disrupted the testis testosterone levels by interfering ER enrichments within StAR 5′ flanking region in rare minnow Gobiocypris rarus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *257*, 109338.

Capítulo 3

Bisfenol-AF (BPAF) desregula a espermatogênese, reduz a qualidade espermática, e afeta a eclosão e a sobrevivência dos embriões de modo intergeracional em zebrafish (*Danio rerio*)

Resumo

O plastificante Bisfenol AF (BPAF) é um contaminante de preocupação emergente, empregado na produção industrial devido a sua alta estabilidade térmica e química. No entanto, constitui uma ameaça à saúde pública e a diferentes ecossistemas. O BPAF é um desregulador endócrino xenoestrogênico, podendo interferir com o eixo HPG (Hipotálamo-pituitária-gonadal) e desregular a síntese de esteroides. Neste estudo, machos adultos de zebrafish foram expostos à concentração ambientalmente relevante de BPAF (0,15 µg/L) por 14 dias. Os efeitos na síntese de 11-KT, espermatogênese e qualidade espermática foram determinados. Além disso, investigamos possíveis impactos do BPAF na informação paterna, realizando reprodução com fêmeas não tratadas, onde avaliamos efeitos intergeracionais, como atraso nas taxas de eclosão, malformações, queda de sobrevivência e alterações de expressão gênica da prole (F1). Adicionalmente, os mesmos parâmetros foram investigados em embriões diretamente expostos ao BPAF (0,15 µg/L). O BPAF estimulou a diferenciação dos cistos espermatogênicos, aumentando os cistos meióticos (espermatócitos; Spc) e pós-meióticos (espermátides; Spt), concomitantemente ao aumento da expressão do gene marcador de prófase da meiose (*sycp3l*). No entanto, a diferenciação vista na espermatogênese não parece ter sido mediada por 11-KT, que não sofreu alteração de concentração tanto nos níveis plasmáticos, como nos testículos. A exposição ao BPAF estimulou nos testículos uma variedade de genes envolvidos em regulação epigenética (*tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4*) e reduziu acentuadamente a motilidade dos espermatozoides. Na prole F1, há evidências de modificação da informação paterna, ocorrendo elevado atraso nas taxas de eclosão, aumento de mortalidade e estímulo dos níveis de mRNA dos genes *vegfa* e *cyp19a1b* após 96 hpf. Da mesma forma, os embriões/larvas diretamente expostos ao BPAF apresentaram atraso na taxa eclosão (em 72h), aumento da mortalidade e forte alteração de expressão gênica, desregulando genes relacionados ao desenvolvimento (*mstn1*, *vegta* e *wnt8*), estrógeno (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1*) e andrógeno (*hsd11β2*). O presente trabalho enfatiza a necessidade de compreender os efeitos do BPAF e seus potenciais impactos aos organismos, além de questionar sua viabilidade como alternativo ao BPA

1. Introdução

O bisfenol AF (4,4′ hexafluoroisopropylidene) difenol; BPAF) é um plastificante substituto ao BPA (BPA-free) (Arancio *et al*., 2019a; Arancio *et al*., 2019b), utilizado em aplicações especializadas, como resinas de fluoropolímero. Empregado na produção industrial devido a sua alta estabilidade térmica e química, que o torna adequado para o uso em materiais que demandam elevada resistência e performance, como certos tipos de plásticos e embalagens para alimentos processados em altas temperaturas, eletrônicos e fibra ótica (revisado por Zhang *et al*., 2013; Lo Nostro *et al*., 2023; Czarny-Krzyminska *et al*., 2023; Rifa & Lavado, 2024).

Diversos estudos apontam o BPAF como potencial ameaça à saúde pública e a diferentes ecossistemas (Pan *et al*., 2020; Krzyminska *et al*., 2023; Chen *et al*., 2024; Xue *et al*., 2024). O BPAF já foi encontrado em amostras humanas de sangue (Jin *et al*., 2018; Li *et al*., 2020a), urina (Yang *et al*., 2014a; Rocha *et al*., 2016), leite materno (Jin *et al*., 2020) e placenta (Pan *et al*., 2020; Xue *et al*., 2024). Russo e colaboradores (2022), identificaram que dentre 30 contaminantes orgânicos (incluindo o BPA e seus análogos) avaliados, o BPAF foi o mais detectado em água de torneira e garrafas d'água comercializadas em diferentes localidades da Itália, estando presente em 67,5 % das amostras em uma concentração média de 387,21 ng/L. Quanto a presença ambiental, o BPAF já foi encontrado em sedimentos (Song *et al*., 2012; Liu *et al*., 2017; Zhao *et al*., 2020; Russo *et al*., 2021; Krzyminska *et al*., 2023) e águas de superfícies, como rios (Yang *et al*., 2014b; Jin & Zhu, 2016; Zhao *et al*., 2020), lagos (Liu *et al*., 2017; Zhao *et al*., 2020; Russo *et al*., 2021) e mares (Xie *et al*., 2022; Gao *et al*., 2023).Nestes ambientes aquáticos, o BPAF foi detectado em níveis baixos, geralmente inferiores a 1 ng/L (Arancio *et al*., 2019a). No entanto, concentrações de até 140 ng/L (Liu *et al*., 2017), 246 ng/L (Yan *et al*., 2014a), 1070 ng/L (Russo *et al*., 2021) e 15.300 ng/L (Song *et al*., 2012) já foram reportadas em lago, rio, lago urbano e rio próximo a um parque industrial, respectivamente. O BPAF é difícil de degradar no ambiente natural (Chen *et al*., 2024), possuindo maior resistência a biodegradação em relação ao BPA (Yang *et al*., 2019; Frankowski *et al*., 2020), e desta forma, maior potencial de acúmulo.

O BPAF é considerado um contaminante ambiental de preocupação emergente (Cesen *et al*., 2019; Chen *et al*., 2020a), um desregulador endócrino (EDC) dada a sua capacidade de se ligar aos receptores de estrógeno (Kitamura *et al*., 2005; Li *et al*., 2012; Mu *et al*., 2018; Okazaki *et al*., 2018), sendo, portanto, um composto xenoestrogênico (Xue *et al*., 2024; Boychenko *et al*., 2024). A reprodução em peixes é controlada pelo eixo hipotalâmico-

hipofisário-gonadal (HPG) através de interações coordenadas de hormônios, incluindo os hormônios esteroides sexuais produzidos pelas gônadas (Ma *et al*., 2012; Ji *et al*., 2013; Baht *et al*., 2021). O BPAF pode interferir com a síntese de hormônios esteroides, desregulando a produção de estrógenos e andrógenos (Feng *et al*., 2012; Shi *et al*., 2015; Feng *et al*., 2016; Yang *et al*., 2016; Li *et al*., 2022; Yu *et al*., 2022; Meng *et al*., 2023; Xue *et al*., 2024). E desta forma, desregular a reprodução. Em camundongos, o BPAF prejudica a espermatogênese, exibindo toxicidade nas espermatogônias (Liang *et al*., 2017) ou reduzindo a contagem espermática (Wu *et al*., 2019; Xue *et al*., 2023). Porém, em peixes, estudos que busquem esclarecer os efeitos do BPAF na espermatogênese e na qualidade espermática são incipientes. Além disso, a espermatogênese depende de mecanismos epigenéticos, cuja desregulação pode ter consequências para a prole (Hazzouri *et al*., 2000; Jirle & Skinner (2007); Strazzullo *et al*., 2017; Champroux *et al*., 2018; Gonzalez-Rojo *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2024). Sendo assim, os efeitos do BPAF sobre a regulação epigenética das células germinativas e suas consequências para a próxima geração também precisam ser melhor compreendidos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do BPAF na reprodução de machos de zebrafish, utilizando quantificação hormonal (11-KT), análises histomorfométricas e de expressão genica dos testículos, contagem espermática, qualidade do esperma (cinética dos espermatozoides) e avaliação de possíveis efeitos na informação paterna através da reprodução com fêmeas não tratadas. Os impactos nos embriões/larvas da geração seguinte (F1) foram analisados através da eclosão, desenvolvimento, sobrevivência e expressão gênica. Além disso, embriões/larvas diretamente expostos ao BPAF foram examinados para os mesmos parâmetros.

2. Material e métodos

2.1 Animais

Machos adultos de zebrafish (*Danio rerio*) foram criados e mantidos no biotério de organismos aquáticos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, UNESP (Botucatu, Brasil) e Department of Biological Sciences, University of Calgary (Calgary, Alberta, Canadá). Os peixes foram alojados em tanques de 6 litros em um sistema de recirculação de água, mantidos a uma temperatura constante de 28 °C e submetidos a um fotoperíodo controlado de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Os parâmetros como salinidade, pH, oxigênio dissolvido e amônia foram monitorados diariamente. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com uma dieta de ração seca comercial (Zeigler®). Todas as

práticas de manejo e experimentação seguiram as diretrizes estabelecidas pela legislação brasileira, regulamentadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2023) e pelos Princípios Éticos em Pesquisa Animal da UNESP (Protocolo 6605200721-CEUA) e diretrizes da University of Calgary Care.

2.2 Químicos

O bisfenol AF (4,4′ hexafluoroisopropylidene) difenol; BPAF, 99% de pureza) foi adquirido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) conforme instrução do fabricante. A concentração de 0,15 µg/L de BPAF já foi encontrada em ambientes aquáticos naturais (Song *et al*., 2012; Yan *et al*., 2014a; Russo *et al*., 2021); além disso, sua relevância ambiental é respaldada por referências prévias onde constam concentrações superiores como significantes do ponto de vista ambiental (Shi *et al*., 2015; Li *et al*., 2020b; Gu *et al*., 2022; Lai *et al*., 2024; Chen *et al*., 2024).

2.3 Design experimental

2.3.1 Macho parental exposto ao BPAF

Machos adultos de zebrafish (n= 96) foram expostos à concentração nominal ambientalmente relevante do BPAF (0,15 µg/L) ou ao controle DMSO (0,00001% v/v) diluídos na água dos aquários por 14 dias, período que abrange dois ciclos espermatogênicos (Leal *et al*., 2009a). Os zebrafish foram alojados em aquários de 10 L, com 12 animais por aquário em um sistema semi-estático; onde a água foi renovada totalmente a cada 2 dias com meio recém preparado (Ji *et al*., 2013; Chen *et al*., 2024). Cada grupo experimental foi dividido em quatro tanques em replicata, totalizando 48 animais por grupo experimental. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Pentair Aquatic Habitats, Florida, USA), e os parâmetros da água (amônia, oxigênio, pH) foram monitorados e controlados diariamente. Após 14 dias, 84 animais foram eutanasiados por imersão em solução de Benzocaína a 0,1%, para as análises de quantificação hormonal (11-KT), de expressão gênica e histomorfometria dos testículos, contagem de espermatozoides e qualidade espermática. Para obtenção dos embriões, 6 machos adultos tratados com BPAF foram reproduzidos com fêmeas não tratadas na proporção 2:1 (machos: fêmeas). Adicionalmente, 6 machos controle (DMSO) também foram reproduzidos com fêmeas não tratadas; as reproduções foram realizadas em três aquários

em replicata para cada grupo. Após a reprodução, os embriões viáveis foram coletados e distribuídos em placas de 24 poços (1 embrião por poço) contendo 1 mL de meio de cultura para embrião (Hank's medium https://www.zfin.org/zf_info/zfbook/chapt10.html#hank1) e mantidos à 28° C. Os embriões, 100 para cada grupo, foram analisados ao longo de 96h; o meio de cultura foi completamente renovado a cada 24 horas durante o período de análise. Os embriões foram submetidos a análise de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência conforme protocolo adaptado do FET teste (OECD, 236). Após esta etapa, as larvas F1 foram imediatamente congelados a -80° C para análise de expressão gênica, sendo 6 pools de 10 larvas para cada tratamento (n = 60 por grupo).

2.3.2 Embriões/larvas diretamente expostos ao BPAF

Machos e fêmeas de zebrafish não expostos foram reproduzidos na proporção de 2:1 (machos: fêmeas) em três aquários em replicata para cada grupo. Os embriões resultantes foram distribuídos em placas de 24 poços (um embrião por poço) contendo 1 mL de meio de cultura para embriões (Hank's medium) e mantidos a 28°C. Os embriões foram tratados com 0,15 µg/L de BPAF ou DMSO (0,00001% v/v) (n=100 para cada condição experimental) por 96 horas; o meio de cultura foi completamente substituído a cada 24 horas com renovação dos tratamentos ao longo do período de análise. Os embriões foram submetidos à análise de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência seguindo o protocolo adaptado do FET teste (OECD, 236). Após esta fase, as larvas foram imediatamente congeladas a -80°C para análise de expressão gênica, sendo 6 pools com 10 larvas por tratamento (n = 60 por grupo).

2.4 Quantificação do 11-KT no plasma

Após 14 dias de exposição, zebrafish machos dos grupos BPAF e controle (n= 8 por condição) foram eutanasiados, e amostras de sangue foram coletadas através do corte do pedúnculo caudal usando seringas heparinizadas. O plasma foi isolado por centrifugação à 4°C por 15 min a 800 x g. Os níveis plasmáticos de 11-KT foram quantificados individualmente por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como nanograma de 11-KT por mL de plasma.

2.5 Quantificação de 11-KT liberada no meio de cultura pelos testiculos (*ex vivo*)

Para avaliar a liberação de 11-KT pelos testículos, machos dos grupos BPAF e controle (n= 8 por condição) foram eutanasiados após 14 dias de exposição, e seus testículos extraídos e cultivados através de um método de cultura de órgãos descrito anteriormente (Leal *et al*., 2009b). Cada testículo de zebrafish foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (0,25 cm^2, 25 μ m de espessura e 0,22 μ m de porosidade) no topo de um cilindro de agarose (1,5% p/v, solução de Ringer, pH 7,4) e colocado em uma placa de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura (L-15). Um dos testículos (grupo BPAF ou controle) foi incubado em presença de 200 ng/ml de rzf Fsh ou (L-15 somente) enquanto seu contralateral foi incubado em meio de cultura (L-15 somente) por 48 h. O Fsh estimula a liberação de 11-KT em peixes (Ohta *et al*., 2007, Skaar *et al*., 2011; Fallah *et al*., 2021) e foi utilizado como controle positivo a liberação do 11-KT no meio de cultura. Após às 48 h, os testículos foram pesados individualmente, e o meio de cultura foi coletado e processado para quantificação do 11-KT liberado pelos testículos conforme descrito anteriormente (Cavaco *et al*., 1998). Os níveis de 11-KT liberados no meio de cultura foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit comercial (Cayman Chemical), seguindo as instruções do fabricante, e expressos como ng de 11-KT/mg de testículos.

2.6 Análises histomorfométricas dos testículos

Testículos de zebrafish (n = 8 para cada condição experimental) foram fixados overnight em Karnovisky (Glutaraldeído 4% paraformaldaído 8% em tampão fosfato pH 7.2) desidratados, incluídos em Technovit (7100-Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha), seccionados em cortes de 3 μ m de espessura (não seriados), e corados com azul de toluidina 0,1% para quantificação dos diferentes tipos de cistos de células germinativas. As lâminas histológicas foram fotografadas na objetiva de 100x do microscópio de luz de alta resolução (Leica DM600 BD, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipado com uma câmera JVC e um computador com o programa Leica QWIN. Imagens dos testículos de cinco campos não sobrepostos escolhidos aleatoriamente por animal (n = 8 lâminas por grupo) foram analisados quantitativamente. A análise foi realizada utilizando uma grade de 540 interseções e com base no número de pontos contados sobre os diferentes tipos de células germinativas investigados:

espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócitos (Spc) e espermátides (Spt) (Fallah *et al*., 2021, Rodrigues *et al*., 2021). Critérios estabelecidos na literatura para células germinativas de zebrafish, como tamanho do núcleo, número de células germinativas por cisto e compactação da cromatina, foram utilizados para análise (Leal *et al*., 2009a; Schulz *et al*., 2010; Morais *et al*., 2013). A proporção de área ocupada pelos diferentes tipos de cistos germinativos foi representada como fold-change em relação ao grupo controle. Para quantificar o número relativo de espermatozoides por testículo, imagens histológicas dos testículos foram analisadas em software ImageJ (NIH, Maryland, EUA). Foram utilizados 20 campos não sobrepostos escolhidos aleatoriamente (objetiva de 100x) por lâmina histológica (n = 6 para cada grupo experimental). (Rodrigues *et al*., 2021, Rodrigues *et al*., 2022). Para tanto, os espermatozoides foram quantificados utilizando o plugin Cell counter do Image J. Após contar todos os espermatozoides por campo, calculou-se a média dos 20 campos e os valores foram expressos como fold-change em relação ao grupo controle.

2.7 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O RNA total (n = 8 para cada condição experimental) foi extraído utilizando o reagente comercial Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, Unites States) conforme as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado como descrito anteriormente (Nóbrega *et al*., 2010). As reações de qPCR foram realizadas utilizando 10 μ L de 2x SYBR-Green Universal Master Mix, 2 μ L de primer forward (1125 nM), 2 μ L de primer reverse (1125 nM), 1 μ L de água DEPC, e 5 μ L of cDNA. Os níveis de mRNA dos genes marcadores de espermatogônias *pou5f3* (POU domain, class 5, transcription factor 3), *nanog* (nanog homeobox), *dazl* (deleted in azoospermia-like); e marcador de prófase da meiose *sycp3l* (synaptonemal complex protein 3) foram avaliados. Além disso, também quantificamos a expressão gênica de enzimas da via esteroidogênica, *cyp19a1a* (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a), *star* (steroidogenic acute regulatory) e *cyp17a1a* (17α-hydroxylase/17,20 lyase/17,20 desmolase); receptores de estrógeno, *esr1*, *esr2a*; e genes de regulação epigenética, *dnmt5* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase beta, duplicate b.3) , *tet1* (tet methylcytosine dioxygenase 1), *ezh2* (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit), *kdm6b* (lysine (K)-specific demethylase 6B), *kat6a* (K(lysine) acetyltransferase 6A) e *hdac4* (histone deacetylase 4). Nas larvas F1 e diretamente expostas (n= 60 por grupo), foram avaliados os níveis de mRNA

dos genes relacionados ao desenvolvimento, *mstn1* (Myostatin), *vegfa* (vascular endothelial growth factor A) e *wnt8* (protein Wnt-8a); estrógeno, *esr1*, *cyp19a1b* (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1b) e *vgt1*(vitellogenin 1); e andrógeno *hsd11β2* (hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2). As expressões dos alvos de mRNA (CTs) foram normalizadas utilizando o gene β-actina como referência, considerado seus níveis de expressão estáveis entre os diferentes grupos experimentais. Os resultados foram expressos como valores relativos ao grupo controle (como fold induction), usando o método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. Os primers (Tabela 1) foram desenhados de acordo com as sequências genéticas do zebrafish disponíveis no GenBank (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Target	**Primers sequence (5´- 3´)**		**Access (NCBI)**
β-actin	AGACATCAGGGAGTGATGGT	Fw	BC045846
	CAATACCGTGTCAATGGGG	Rv	
pou5f3	GAGAGATGTAGTGCGTGTAT	Fw	BC049295.1
	GCTCGTAATACTGTGCTTCA	Rv	
nanog	TGTCCTACAACAAGACTGAGCC	Fw	BC162315.1
	CAGGAATCTGGCGTGTGGG	Rv	
dazl	AGTGCAGACTTTGCTAACCCTTATGTA	Fw	BC076423.1
	GTCCACTGCTCCAAGTTGCTCT	Rv	
star	CCTGGAATGCCTGAGCAGAA	FW	AF220435
	ATCTGCACTTGGTCGCATGAC	Rv	
cyp17a1	GGGAGGCCACGGACTGTTA	FW	NM_212806.3
	CCATGTGGAACTGTAGTCAGCAA	Rv	
sycp3l	AGAAGCTGACCCAAGATCATTCC	FW	BC115343
	AGCTTCAGTTGCTGGCGAAA	Rv	
esr1	GGTCCAGTGTGGTGTCCTCT	FW	NM_152959.1
	AGAAAGCTTTGCATCCCTCA	Rv	
esr2a	GCCGACTCCGAAAGTGCTAT	FW	NM_180966.2
	AGTGATATGCGCACCACCTC	Rv	
dnmt5	TCATTGACTTGGGGGAAGAG	FW	AB196916.1
	GCTGCTGCTGCACTTATCAT	Rv	
tet1	GCAACCACTCCCATCCTTCGAC	FW	XM_021472702.1
	TGTTAGCGACTGACGGGTAGGGAC	Rv	
ezh2	CAGACTCATCGGCACAAAGA	FW	NM_001077279.1
	TGACACAAGGGCAAGAACTG	Rv	
kdm6b	GCCGTCAACGAAGTCCTATC	FW	NM_001030178.2
	CTCCTTGTGCCTCTTCTTGG	Rv	
kat6a	CACCAGAGAAGCCACTGTCA	FW	NM_001123312.4
	TAATTACCCCGTCCCCTTTC	Rv	

hdac4	TGTGTTTCTGCTTTGCTTGG	FW	NM_001123312.4
	GTGACCGTCTCTGCCTCTTC	Rv	
mstn1	GTCCGGTGCGTGGTGAGGTTC	FW	AF540956.1
	AGCTCGCTTTCCTCCGTGGC	Rv	
vegfa	TGCTCCTGCAAATTCACACAA	FW	NM_131408.3
	ATCTTGGCTTTCACATCTGCAA	Rv	
wnt8	GGACTACATGGAACTGAAGG	FW	KM655723.1
	CTGTCTCAATCCTCCTCTCTT	Rv	
esr1	ACTCTCACCCATGTACCCTAAGG	FW	NM_152959.1
	CGGGTAGTATCCCACTGAAGC	Rv	
cyp19a1b	AAAGAGTTACTAATAAAGATCCACCGGTAT	FW	AF226619.1
	TCCACAAGCTTTCCCATTTCA	Rv	
vgt1	AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG	FW	NM_170767
	GATGGGAACAGCGACAGGA	RW	
hsd11β2	GGGGGTCAAAGTTTCCACTA	FW	NM_212720.2
	TGGAAGAGCTCCTTGGTCTC	Rv	

2.8 Análise da qualidade espermática

Zebrafish machos dos grupos BPAF e controle (n= 10 por condição) foram eutanasiados e seus testículos dissecados. Os testículos foram imersos em solução salina balanceada de Hank (HBSS) para auxiliar na liberação do esperma (Chen *et al*., 2017) e mantê-lo inativado (Babiak *et al*., 2012). Além disso, os testículos foram gentilmente fragmentados com o auxílio de uma pinça para facilitar a dissociação do sêmen. O sêmen foi então utilizado para a análise da qualidade espermática. Para tanto, as amostras foram então diluídas em água Miliq para ativação espermática (proporção 1 µL de sêmen para 2 µL de água) e pipetadas em câmara de Neubauer espelhada (0,1 mm profundidade), coberta por lamínula de vidro (24x24mm) (Sanches *et al*., 2013). A câmara foi rapidamente levada ao microscópio de luz trinocular (Solarist Bel) previamente focado em objetiva de 10x acoplado com uma câmera Basler acA640-120gc (http://www.baslerweb.com), conectada ao computador (intel core i7© CPU 2,4 GHz, 8Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows 8©. Foram então gravados vídeos (100 frames por segundo) para a realização das análises dos parâmetros computadorizados conforme procedimentos detalhados por Sanches e colaboradores (2013), utilizando o software livre ImageJ/plugin CASA. Foram avaliados o número total de espermatozoides e os parâmetros de cinética: percentual de Taxa de Motilidade (MOT), Velocidade Curvilinear (VCL), Velocidade Média de Deslocamento (VAP) e Velocidade em Linha Reta (VSL).

2.9 Análise de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência dos embriões (FET) teste adaptado

Os embriões/larvas foram analisados utilizando uma da lupa Olympus mcv10 com auxílio de lentes X-citem120 LED por 96h. A cada 24h, foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos que indicam dano ao embrião e potencial letalidade, incluindo: Coagulação dos ovos fertilizados, ausência da formação de somitos, não separação da cauda do saco vitelínico, perda dos batimentos cardíacos (a partir de 48h), deformidades da coluna espinhal, e presença de edema de saco vitelínico e pericárdico (adaptado de OECD 236, Fish Embryo Acute Toxicity, FET, Test). Também foram observadas as taxas de eclosão (a partir de 48h) definidas por: Taxa de eclosão (%) = (número de embriões eclodidos/total de embriões) x 100. Além disso, a taxa de mortalidade foi determinada pela soma dos embriões coagulados ou com perda de batimento cardíaco ao longo das 96h.

2.10 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido de Teste de variância e homogeneidade de Bartlett. A comparação entre os grupos para a quantificação do 11-KT no plasma foi realizada por teste t não pareado, enquanto a comparação da liberação de 11-KT pelos testículos dos diferentes grupos/condições experimentais se deu pelo teste one-way ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os dois grupos na histomorfometria e expressão gênica foram identificadas usando o teste t não pareado ($p < 0,05$). Os parâmetros da qualidade espermática gerados pelo software ImageJ/plugin CASA foram comparados entre os grupos por meio do teste t não pareado. Os dados de eclosão e desenvolvimento dos embriões foram comparados entre os grupos pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Para a análise de sobrevivência, foi construída a curva Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos se deu pelo teste não paramétrico log-rank (Mantel cox). Os dados foram apresentados como média ± SEM (erro padrão da média). Para todas as análises estatísticas utilizamos o software GraphPad Prism (versão 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA, http://www.graphpad.com).

3. Resultados

3.1 Efeito do BPAF na concentração do 11-Ketotestosterona (11-KT) do zebrafish

Para avaliar o impacto do BPAF na produção de andrógeno, medimos a concentração plasmática de 11-KT após a exposição ao BPAF (Fig 1A) e a liberação de andrógenos pelos testículos dos animais expostos no meio de cultura (Fig 1B). Vimos que o tratamento com BPAF não afetou as concentrações plasmáticas de 11-KT, (Fig 1A) nem a sua liberação pelos testículos (Fig 1B). A incubação dos testículos do grupo controle com Fsh estimulou a liberação de 11-KT em relação ao controle (Fig 1B). No entanto, a incubação dos testículos expostos ao BPAF *in vivo* com Fsh não apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos. Mostrando que o tratamento com BPAF *in vivo* atenuou a produção de 11-KT estimulada pelo Fsh.

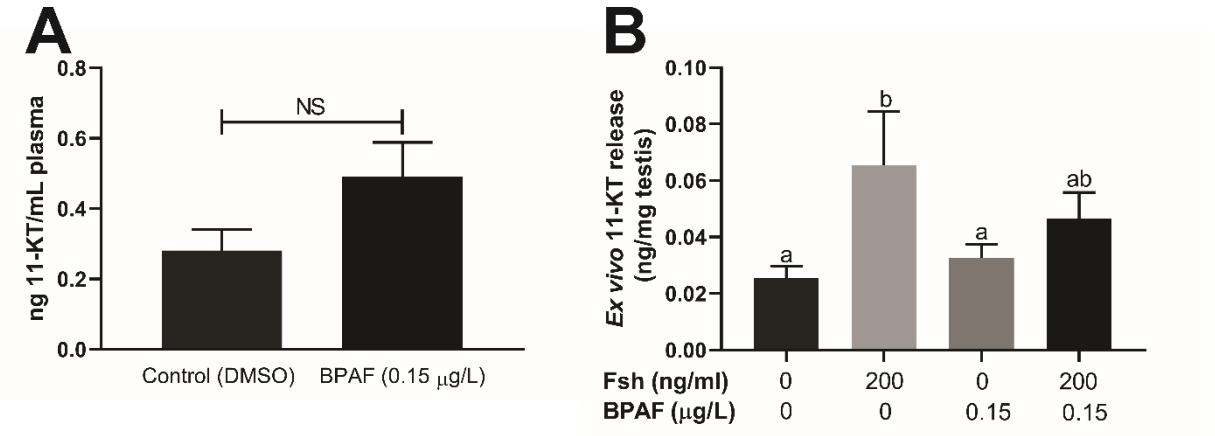


Fig. 1. Quantificação do 11-KT após exposição ao BPAF. (A) Níveis plasmáticos de 11-Ketotestosterona (11-KT) (ng/mL de plasma) em machos de zebrafish após 14 dias de exposição ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 μg/L). (B) Liberação de 11-KT de explantes testiculares (ex vivo) de zebrafish previamente tratados com DMSO ou BPAF (0,15 μg/L) por 14 dias. Testículos incubados em meio de cultura (L-15) em presença ou ausência de Fsh (200 ng/ml) por 48 h. As barras representam a média ± SEM (n = 8). (NS) sem diferença significativa. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.2 Análise histomorfométrica dos efeitos do BPAF na espermatogênese do zebrafish

O tratamento com BPAF promoveu o aumento significativo da proporção de área ocupada por espermatócitos (Spc) e espermátides (Spt) em relação ao grupo controle, indicando estímulo dos estágios finais da espermatogênese (Fig 2A). No entanto, a quantificação do número relativo de espermatozoides não apresentou diferença significativa após o tratamento

com BPAF (Fig 2B). Além disso, a área ocupada pelos cistos de espermatogônias (A_{und}, A_{diff} e SpgB) não foi afetada.

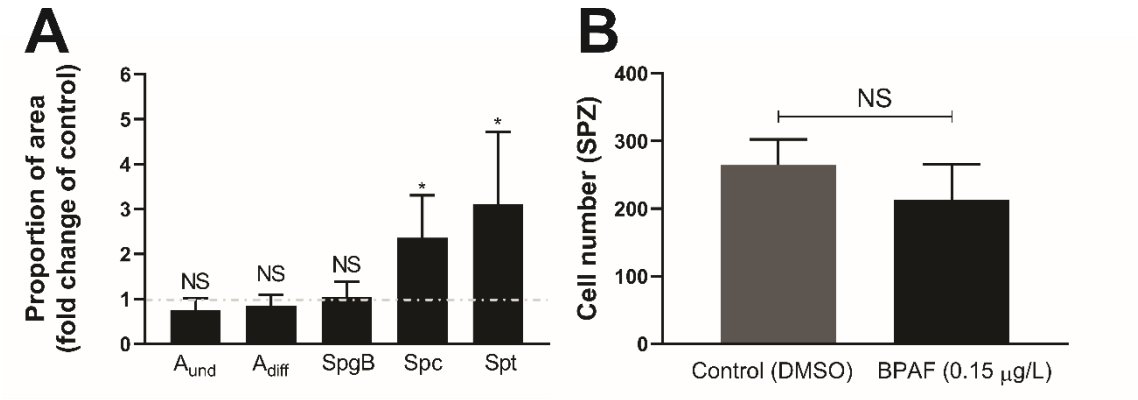


Fig. 2. Análises histomorfométricas dos testículos após exposição ao BPAF. (A) Proporção de área de superfície ocupada por cistos espermatogênicos do zebrafish após 14 dias de exposição ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L). Cistos de espermatogônia tipo A indiferenciada (A_{und}), espermatogônia tipo A diferenciada (A_{diff}), espermatogônia tipo B (SpgB), espermatócito primário (Spc) e espermátides (Spt). Dados representados como fold change do grupo controle. (B) Número de espermatozoides por campo obtidos através do IMAGEJ Software. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=6). (*) representa diferença significativa observada entre os diferentes grupos com $p < 0,05$; (NS) sem diferença significativa.

3.3 Análise de expressão gênica dos efeitos do BPAF na espermatogênese do zebrafish

O BPAF modulou a expressão gênica dos testículos de zebrafish após os 14 dias de exposição em relação ao grupo controle (Fig 3A-D). A expressão dos genes marcadores de espermatogônias (*pou5f3*, *nanog* e *dazl*) não foram afetados pelo tratamento (Fig 3A). Por outro lado, a exposição ao BPAF induziu a transcrição do gene *sycp3l* (marcador de espermatócito primário) (Fig 3A). Entre as enzimas esteroidogênicas avaliadas, houve aumento da expressão do gene *cyp19a1a* (Fig 3B). Não sofreram alteração de expressão gênica os receptores de estrógeno (*esr1* e *esr2a*) (Fig 3C). A exposição ao BPAF também modulou os níveis de mRNA das enzimas de regulação epigenética, estimulando a expressão de *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4* (Fig 3D).

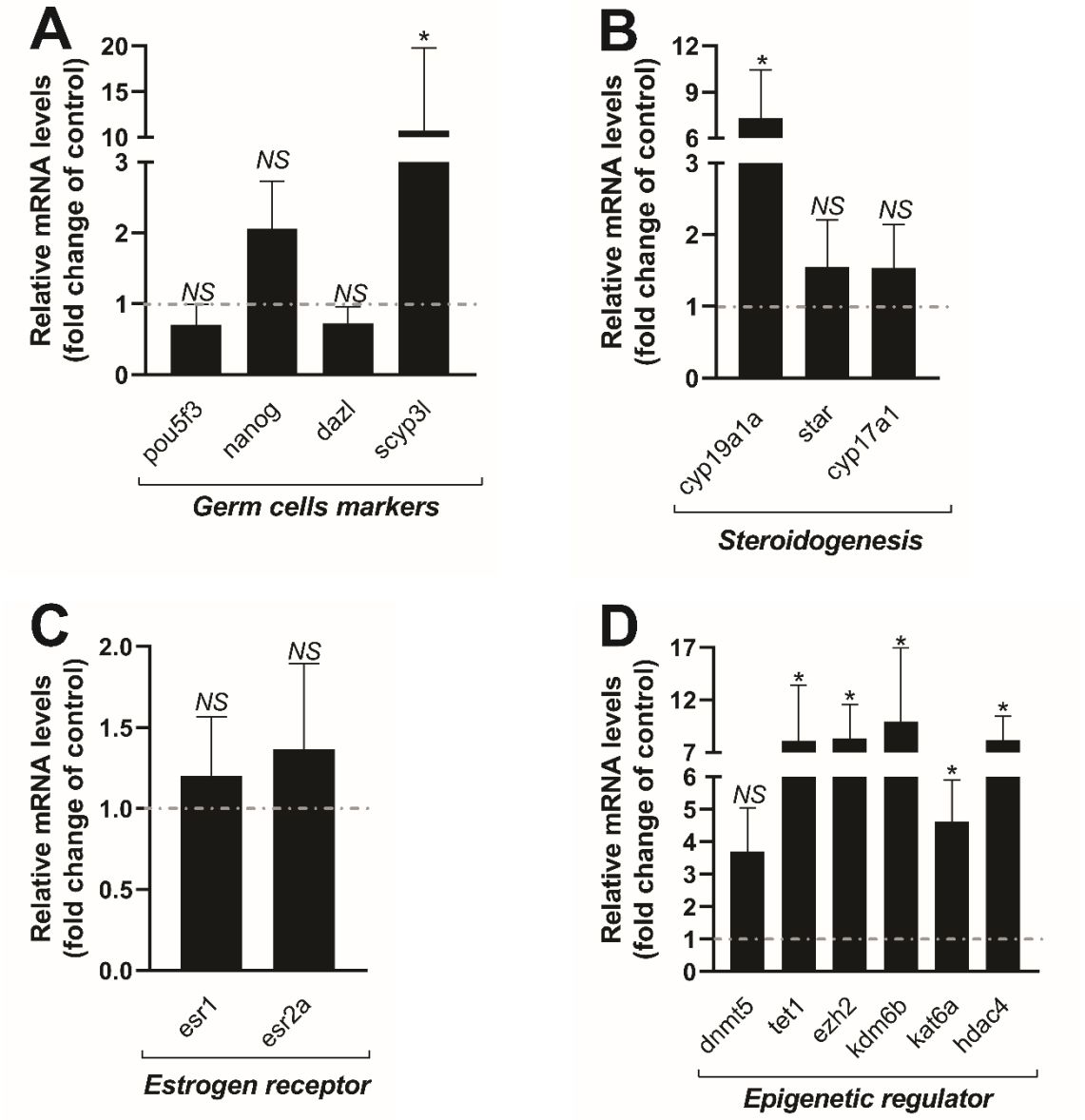


Fig. 3. Análise de expressão gênica dos testículos após exposição ao BPAF. (A) Expressão relativa dos genes marcadores de células germinativas (*pou5f3*, *nanog*, *dazl* e *scyp3l*), enzimas de esteroidogênese (*cyp19a1a*, *star*, *cyp17a1*), receptores de estrógeno (*esr1*, *esr2a*), e regulação epigenética (*dnmt5*, *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4*) em testículos de zebrafish após 14 dias exposição ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L). Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β- actina) e expressos relativos ao grupo controle (DMSO). Os dados estão apresentados com a média ± erro padrão (n=8) e como fold induction do controle (DMSO) representado pela linha tracejada. (*) representa diferença significativa com $p < 0,05$. (NS) sem diferença significativa.

3.4 Efeitos do BPAF na qualidade espermática dos zebrafish

A exposição de machos de zebrafish ao BPAF reduziu a qualidade espermática em relação ao grupo controle, diminuindo drasticamente a motilidade (MOT) dos espermatozoides

(Fig. 4B). No entanto, a produção de espermatozoides (Fig 4A) e os parâmetros de velocidade avaliados, velocidade curvilinear (VCL) (Fig 4C), velocidade média de deslocamento (VAP) (Fig 4D) e velocidade em linha reta (VSL) (Fig 4E) não foram impactados.

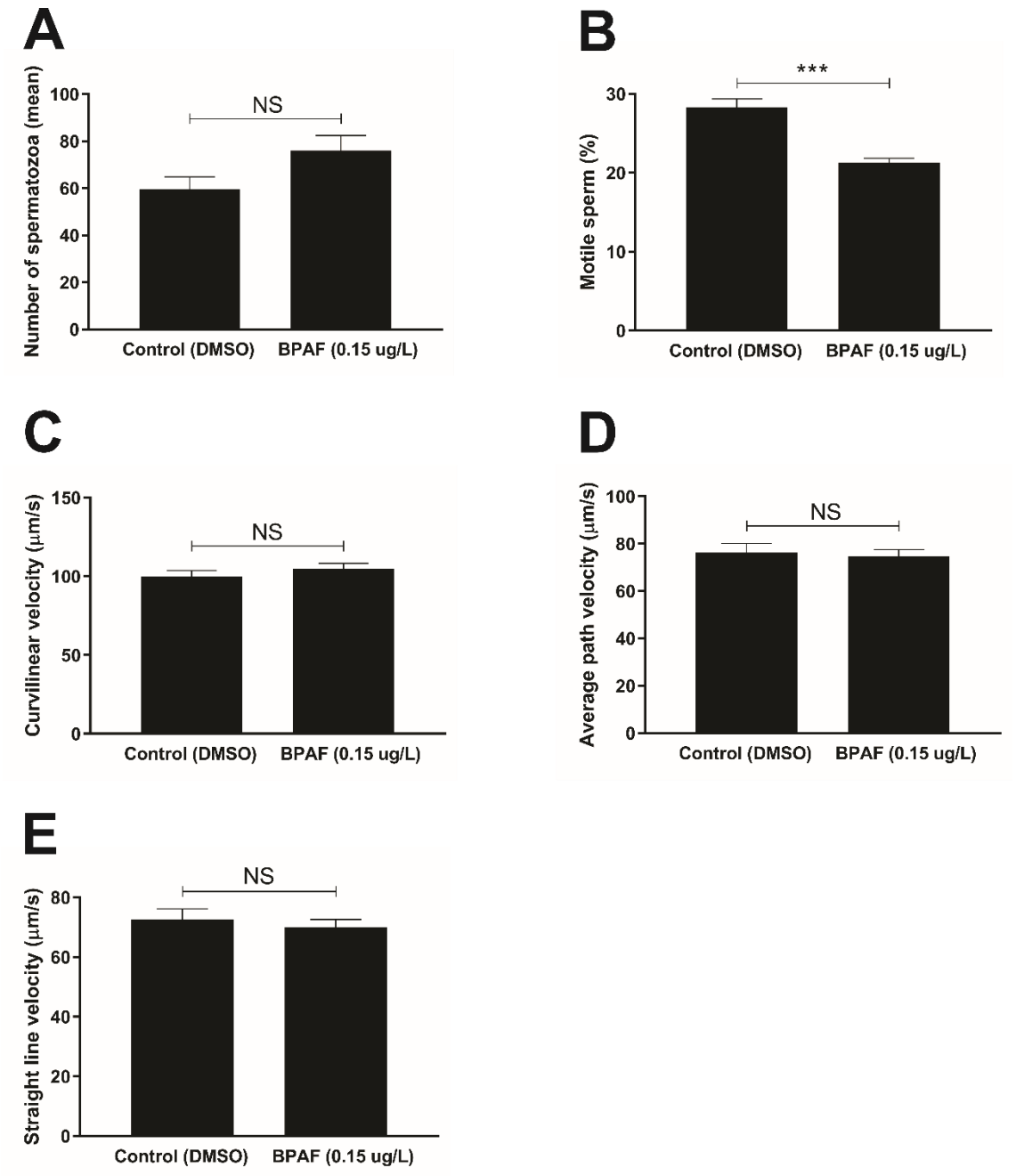


Fig. 4. Análise de motilidade (COMPUTADORIZADA – CASA) dos espermatozoides após exposição do zebrafish ao BPAF. Parâmetros de cinética espermática do zebrafish após 14 dias exposição ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L) determinados pelo software CASA. Foi utilizado H_2O como ativador dos espermatozoides tanto no grupo controle (DMSO) como no grupo BPAF (0,15 µg/L). (A) Número de espermatozoides (Média), (B) Taxa de Motilidade (MOT, %), (C) Velocidade Curvilinear (VCL, µm/s), (D) Velocidade Média de Deslocamento

(VAP, μm/s), (E) Velocidade em Linha Reta (VSL, μm/s). Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=10). (***) representa diferença significativa com $p < 0,001$. (NS) sem diferença significativa.

3.5 Efeitos da exposição do macho parental ao BPAF na eclosão, desenvolvimento e sobrevivência dos embriões/larvas da geração F1 e diretamente expostos

A exposição parental ao BPAF resultou em atraso e redução das taxas de eclosão dos embriões da geração F1, com taxa final de eclosão de 80% comparado à 95% do grupo controle após as 96 h de análise (Fig 5A). Os embriões/larvas diretamente expostos ao BPAF apresentaram atraso da taxa de eclosão em 72h, tendo o grupo BPAF taxa de eclosão de 76% em relação à 90% do grupo (Fig 6A). Nenhum dos parâmetros de desenvolvimento apresentou diferença significativa, tanto na geração F1 (Fig 5 B-F), como nos embriões/larvas diretamente expostos ao BPAF (Fig 6 B-E), em relação aos seus respectivos controles. Além disso, nas larvas diretamente expostas ao BPAF, nenhum edema de saco vitelínico (0%) foi encontrado.

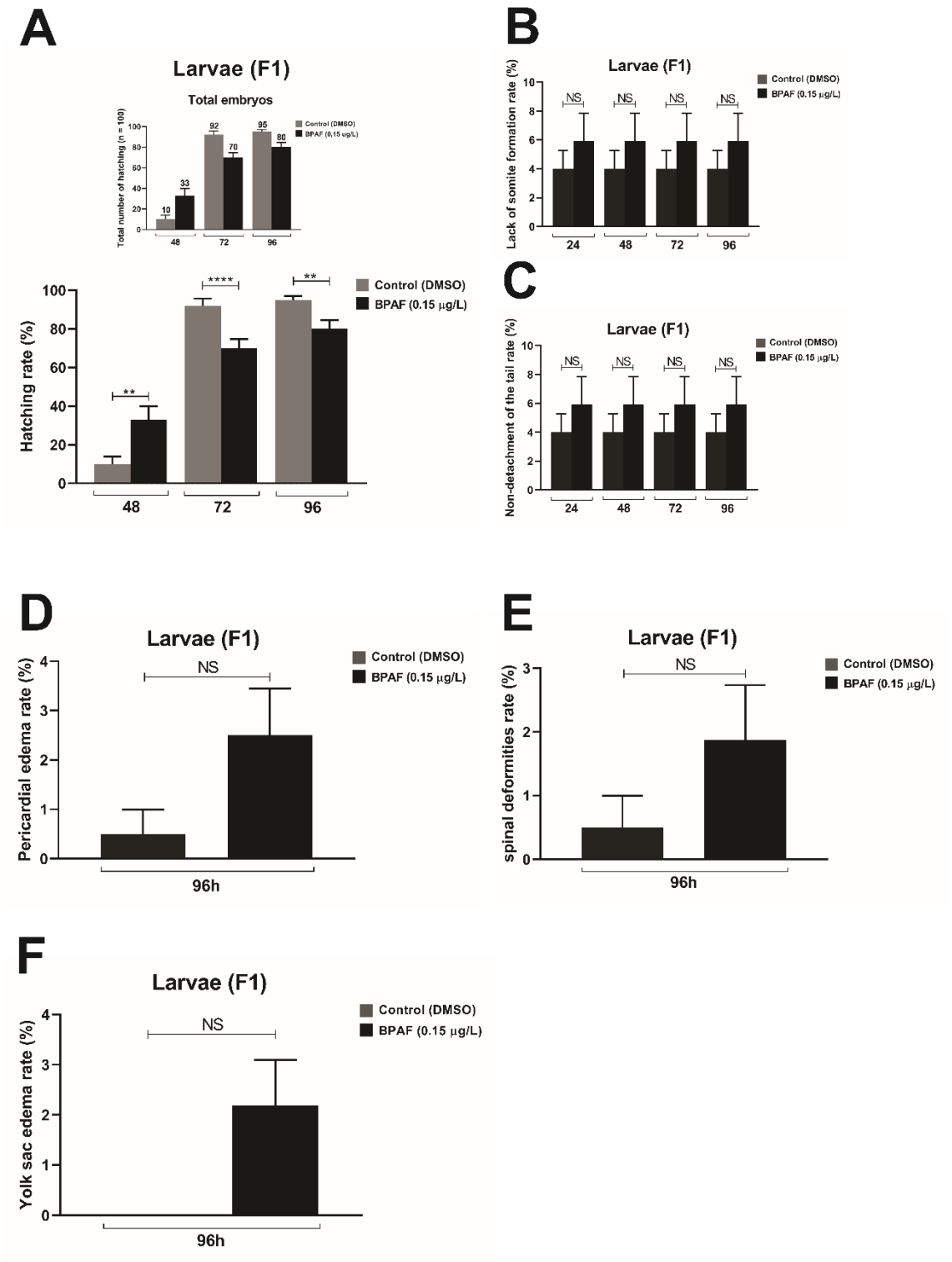


Fig. 5. Efeitos na eclosão e desenvolvimento de embriões/larvas de zebrafish. (A) Eclosão das larvas (F1) originadas da reprodução do macho parental exposto ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L). **(B-F)** Desenvolvimento dos embriões/larvas (F1) após 96h em meio embriônico. (B) ausência de formação de somitos (C) não desprendimento da cauda (D) edema pericárdico (E) deformidade da coluna espinhal (F) edema de saco vitelínico. Foram analisados os seguintes parâmetros de alteração de desenvolvimento: ausência da formação de somitos, não desprendimento da cauda, edema pericárdico, edema do saco vitelínico e deformidade da coluna

espinhal. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=100). (**) e (****) representa diferença significativa com p<0,01 e p<0,0001, respectivamente. (NS) sem diferença significativa.

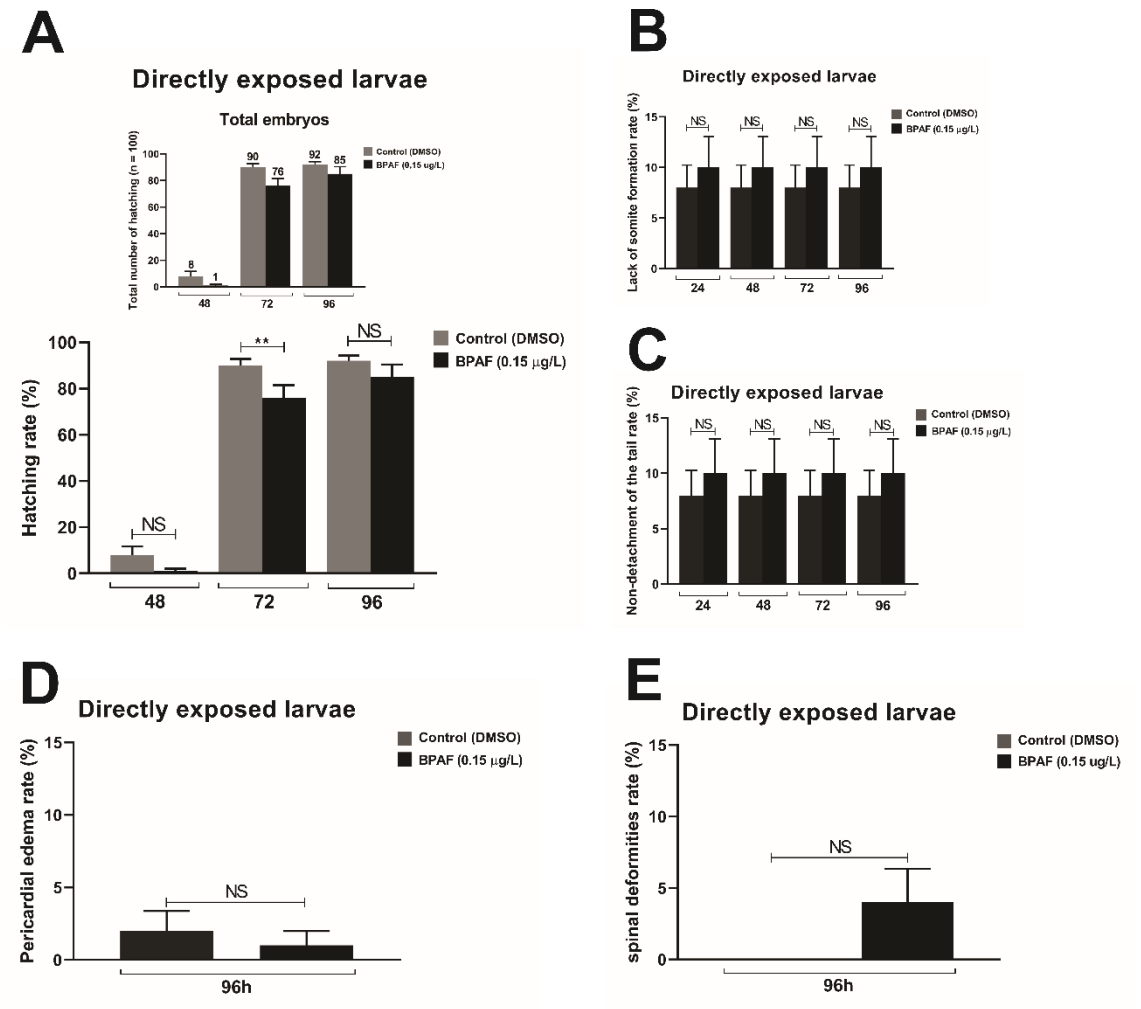


Fig. 6. Efeitos na eclosão e desenvolvimento de embriões/larvas de zebrafish. (A) Eclosão das larvas diretamente expostas ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L) após 96h pós-fertilização. **(B-E)** Desenvolvimento dos embriões/larvas em meio embriônico. (B) ausência de formação de somitos (C) não desprendimento da cauda (D) edema pericárdico (E) deformidade da coluna espinhal. Nas larvas diretamente expostas não foram observados edema de saco vitelínico tanto no grupo controle (DMSO) como no grupo tratado (BPAF). Foram analisados os seguintes parâmetros de alteração de desenvolvimento: ausência da formação de somitos, não desprendimento da cauda, edema pericárdico, edema do saco vitelínico e deformidade da coluna espinhal. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão (n=100). (**) representa diferença significativa com p<0,01. (NS) sem diferença significativa.

Quanto as taxas de sobrevivência, a exposição paterna ao BPAF aumentou a mortalidade dos embriões/larvas F1 ($p < 0,01$) ao longo das 96 h de observação (Fig 7A), atingindo 74 % de sobrevivência em relação à 93% do grupo controle ao final do período. Da mesma forma, nos embriões/larvas diretamente expostos ao BPAF, ocorreu aumento da mortalidade ao longo

das 96 h ($p < 0,05$), alcançando 89% de sobrevivência em relação a 97% do grupo controle (Fig 7B).

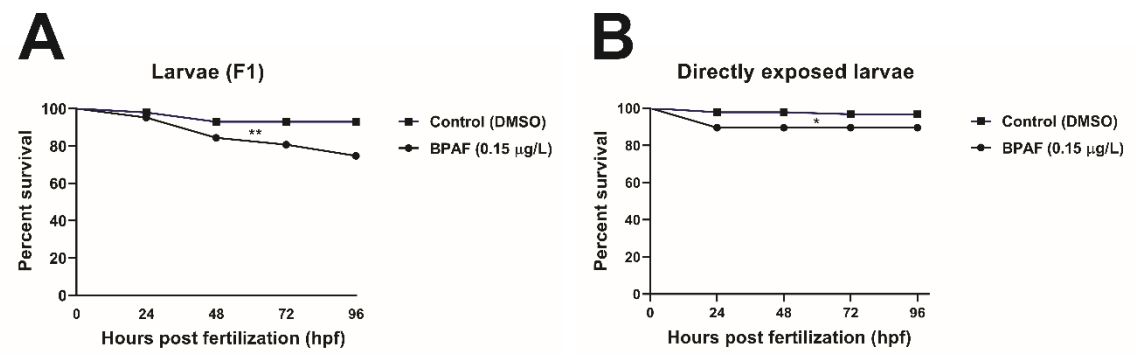


Fig. 7. Curva de sobrevivência dos embriões/larvas de zebrafish geração F1 e diretamente expostas. (A) Curva de sobrevivência dos embriões/larvas (F1) originados da reprodução do macho parental exposto ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L) mantidos em meio embriônico e (B) embriões/larvas diretamente expostos ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L) ao longo de 96h pós-fertilização. (*) e (**) representam diferença significativa com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. Curva de Kaplan-Meier seguida por teste log-rank, n = 100 por grupo.

3.6 Análise de expressão gênica das larvas (F1) e larvas diretamente expostas ao BPAF.

Avaliamos os níveis de mRNA dos genes relacionados ao desenvolvimento (*mstn1*, *vegta* e *wnt8*), estrógeno (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1*) e andrógeno (*hsd11β2*) nas larvas da geração F1 (Fig 8A) e larvas diretamente expostas ao BPAF (Fig 8B). A exposição parental ao BPAF foi capaz de afetar a expressão gênica das larvas F1 aumentando os níveis de mRNA de *vegta* e *cyp19a1b* em relação ao grupo controle (Fig 8A). As larvas diretamente expostas ao BPAF apresentaram forte estímulo de todos os genes avaliados, a exceção do *vegta,* que foi reprimido (Fig 8B).

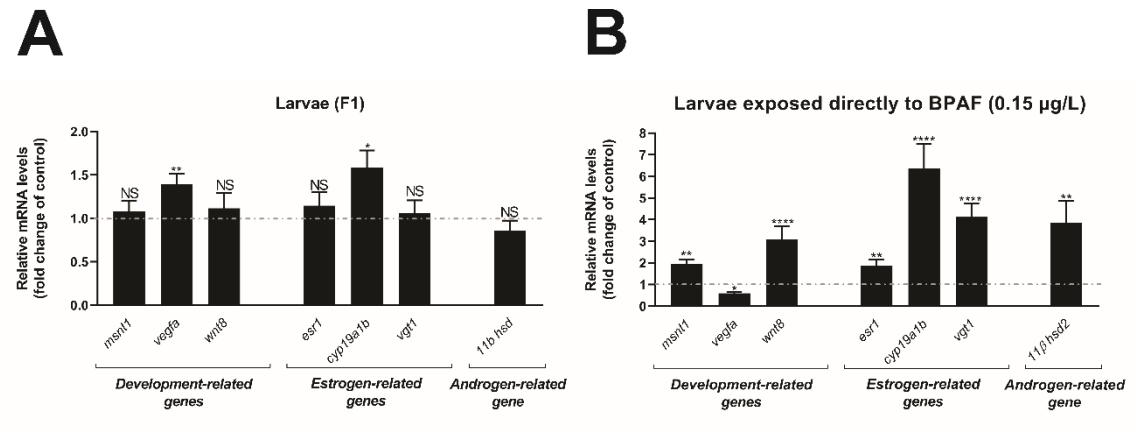


Fig. 8. Análise de expressão gênica das larvas de zebrafish. Expressão relativa dos genes relacionados ao desenvolvimento (*mstn1*, *vegfa* e *wnt8*), estrógeno, (*esr1*, *cyp19a1b* e *vgt1)* e andrógeno *(hsd11β2*) em larvas de zebrafish. (A) larvas (F1) originadas da reprodução do macho parental exposto ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L) após 96h em meio embriônico (B) larvas diretamente expostas ao DMSO (controle) ou BPAF (0,15 µg/L) por 96h pós-fertilização. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β- actina) e expressos relativos ao grupo controle (DMSO). Os dados estão apresentados com a média ± erro padrão (n= 6 pools de 10 embriões por grupo) e como fold induction do controle (DMSO) representado pela linha tracejada. (*), (**) e (****) representa diferença significativa com $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente. (NS) sem diferença significativa.

4. Discussão

O BPAF é um desregulador endócrino (EDC) de preocupação emergente, com capacidade de interferir na síntese de hormônios sexuais como a testosterona e o estradiol em diversos modelos (Feng *et al*., 2012; Feng *et al*., 2016; Yang *et al*., 2016; Li *et al*., 2022; Yu *et al*., 2022; Xue *et al*., 2024). Em machos de zebrafish, foi relatado que o BPAF promoveu redução de testosterona e aumento dos níveis plasmáticos de 17-β estradiol e 11-KT (Shi *et al*., 2015; Yang *et al*., 2016; Meng *et al*., 2023). O 11-KT é um dos principais hormônios androgênicos em peixes teleósteos (De Waal *et al* 2008; Schulz *et al*., 2010; Skaar *et al*., 2011; Crespo *et al*., 2019). Em machos adultos de zebrafish, a exposição a 20 µg/L de BPAF por 28 dias estimulou 11-KT (Meng *et al*., 2023). No entanto, no mesmo trabalho, 200 µg/L de BPAF por 28 dias não apresentou diferença significativa. Aqui, nosso estudo revela que o BPAF não afetou os níveis plasmáticos de 11-KT nem sua liberação *ex vivo* pelos testículos dos animais expostos. Esses dados reforçam a resposta variável do 11-KT ao BPAF de acordo com a concentração. A produção de 11-KT *ex vivo* (*in vitro*) em peixes é estimulada pelo Fsh (Kamei *et al*., 2005; Shulz *et al*., 2010; Skaar *et al*., 2011; Fallah *et al*., 2021). No entanto, a exposição

ao BPAF não induziu a liberação de andrógenos mediada pelo Fsh como observado no grupo controle. Esse resultado indica uma interferência do BPAF na ação do Fsh.

O BPA é conhecido por prejudicar a espermatogênese, perturbando a proporção de cistos mais diferenciados, como espermatócitos e espermátides, e diminuindo a produção espermática, como reportado em mamíferos (revisado por Jin *et al*., 2013, Liu *et al*., 2013; Xie *et al*., 2016; Jenardhanan *et al*., 2016; Liu *et al* 2021; Lo Nostro *et al*., 2023) e em peixes (Sohoni *et al*., 2001; Lahnsteiner *et al*., 2005; Gonzalez-Rojo *et al*., 2019; Faheem & Bhandari, 2021 Batista-Silva *et al*., 2022, Mostari *et al*., 2022; Reis *et al*., 2022). Quanto ao BPAF, trabalhos em camundongos indicam que ele também é repressor da espermatogênese, reduzindo a produção de espermatozoides (Wu *et al*., 2019, Xue *et al*., 2023). No entanto, não identificamos estudos que tenham avaliado seus impactos na espermatogênese de peixes, quantificando os cistos espermatogênicos ou a produção espermática.

A análise da proporção de área dos cistos espermatogênicos revelou que o BPAF estimulou os estágios finais da espermatogênese, aumentando os cistos meióticos (espermatócitos; Spc) e pós-meióticos (espermátides; Spt). Não houve alteração dos cistos espermatogoniais (A_{und}, A_{diff} e SpgB), alinhado a não modulação de seus genes marcadores (*pou5f3*, *nanog*, *dazl*). Juntos, os dados demonstram que o BPAF estimula a diferenciação dos cistos espermatogênicos. O aumento da expressão do gene marcador de prófase da meiose (*sycp3l*) (Saito *et al* 2011; Tovo-Neto *et al*., 2020; Dai *et al*., 2021) corrobora este ambiente pró-diferenciação e entrada na meiose. Porém, o BPAF não influenciou no número de espermatozoides (Spz). Sugerindo um potencial bloqueio no processo de transformação de espermátides em espermatozoides.

A enzima Cyp19a1 (aromatase) está envolvida na síntese de estrógeno através da conversão de andrógenos (Tong *et al*., 2003; Hinfray *et al*., 2013). O aumento dos níveis de mRNA do gene *cyp19a1a* sugere ação estrogênica. Dada a não alteração de 11-KT, é possível que o estímulo dos estágios meióticos e pós-meióticos esteja associado a testosterona, como descrito em mamíferos (Vigier *et al*., 2004; Walker (2010); Walker (2011). No entanto, tal suposição é pouco provável, visto que o 11-KT é o principal indutor da espermatogênese em peixes (Miura *et al* 1991; Cavaco *et al*., 1998; Miura & Miura*.,* 2003; De Waal *et al* 2008; Zheng *et al* 2020), não sendo a ação direta da testosterona associada a um papel relevante no estimulo na espermatogênese de peixes em relação ao 11-KT (Cavaco *et al*., 1998; Cavaco *et al*., 2001; Bhat *et al*., 2021). Além disso, BPAF foi relacionado a redução de testosterona no

zebrafish (Shi *et al*., 2015; Yang *et al*., 2016; Meng *et al*., 2023). Desta forma, mecanismos ainda não identificados podem estar atuando na ação do BPAF em promover os estágios finais da espermatogênese neste trabalho.

Neste estudo, observamos que o BPAF estimulou uma variedade de genes relacionados à regulação epigenética, aumentando os níveis de mRNA dos genes envolvidos nos processos de desmetilação do DNA (*tet1*), metilação de histonas (*ezh2*), desmetilação de histonas (*kdm6b*), acetilação de histonas (*kat6a*) e desacetilação de histonas (*hdac4*). O estímulo conjunto das expressões de genes envolvidos em processos opostos, pode sugerir um mecanismo de equilíbrio para prevenir o excesso de qualquer um dos mecanismos epigenéticos, de modo a manter a homeostase da regulação.

Tendo em vista que a exposição ao BPAF alterou a expressão de genes envolvidos na regulação epigenética, o que pode modificar o transcriptoma do esperma durante a espermatogênese, e assim afetar a qualidade dos espermatozoides (Wang *et al*., 2004; Miller & Ostemeier, 2006, Schagdarsurengin & Steger, 2016; Valcarce *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2024). Ademais, considerando que desreguladores endócrinos, como os bisfenóis, podem comprometer a produção e cinética dos espermatozoides em diferentes organismos (Hatef *et al*., 2013, Chen *et al*., 2017; Carnevalli *et al*., 2018; Shaliutina *et al*., 2021; Nguyen *et al*., 2022; Mostari *et al*., 2022; Torres-Badia *et al*., 2023; Sahu *et al*., 2023). Aqui, analisamos a qualidade espermática através da produção, motilidade e parâmetros de movimentos (cinética) dos espermatozoides.

Em zebrafish, a exposição ao BPA reduz a motilidade espermática (Chen *et al*., 2017; Silveira *et al*., 2019; Mostari *et al*., 2022). Da mesma forma, os resultados da análise da qualidade espermática através do software ImageJ/CASA, mostraram que a exposição ao BPAF reduziu substancialmente a motilidade, um dos principais parâmetro para avaliação da qualidade espermática (Rurangwa *et al*., 2004; Awad *et al*., 2011; Kowalski & Cejko, 2019; Hidayatullah *et al*., 2021). A redução da motilidade dos espermatozoides pode comprometer a capacidade do esperma de encontrar e fertilizar o oócito (Graham *et al*., 2001; Nowicka-Bauer & Nixon, 2020; Castro *et al*., 2024). Desta forma, o presente estudo apresenta evidências de que o BPAF tem potencial de prejudicar a fertilidade dos machos pela degradação da qualidade do esperma. Até onde temos conhecimento, este estudo é pioneiro em investigar os efeitos do BPAF na qualidade espermática, analisando a cinética dos espermatozoides em um organismo modelo.

Para avaliar a viabilidade da prole decorrente de possíveis alterações da informação paterna devido à exposição ao BPAF, examinamos a taxa de eclosão, desenvolvimento e sobrevivência dos embriões/larvas (F1) durante 96h pós-fertilização. Houve evidente atraso nas taxas de eclosão e acentuada mortalidade em relação ao grupo controle. De forma semelhante, Meng e colaboradores (2023) encontraram indução de mortalidade nas larvas F1, após machos parentais serem exposto a 20, 200 e 500 µg/L de BPAF por 7, 14 ou 21 dias. Evidentemente, a exposição aos contaminantes ambientais geram impactos que podem ser transferidos dos adultos expostos para a prole e, assim, continuar a ter consequências nos descendentes não expostos por gerações. (Zhang *et al*., 2022). A maioria dos EDCs tem fortes propriedades lipofílicas e hidrofóbicas, que os tornam fáceis de acumular nos organismos, podendo ser diretamente transmitidos aos descendentes através de células germinativas (Zhang *et al*., 2024). No entanto, até onde sabemos, em peixes a transferência direta de contaminantes ambientais para as subsequentes gerações foi apenas demonstrada após a reprodução de fêmeas expostas (Qiu *et al*., 2020) ou machos e fêmeas expostos (Shi *et al*., 2018; Yu *et al*., 2021). Neste último caso, é mais provável que os contaminantes tenham sido transferidos via materna (Shi *et al*., 2018), estando presentes no oócito. A escassez de evidências de transferência direta de contaminantes via espermatozoides para as gerações seguintes, torna mais plausível que mecanismos epigenéticos sejam responsáveis pelos impactos destrutivos encontrados na prole presentes na literatura e no atual trabalho.

Desta forma, propomos que potenciais impactos epigenéticos no desenvolvimento dos gametas podem estar relacionados as alterações observadas na prole. Proposição fundamentada na capacidade do BPAF em ter regulado os genes *tet1*, *ezh2*, *kdm6b*, *kat6a* e *hdac4* nos testículos. Estudos indicam que modificações nos níveis de mRNA do esperma, como resultado de alterações epigenéticas, podem ser responsáveis por anomalias na prole após exposição do zebrafish paternal ao BPA (Lombó *et al*., 2015; Lombó *et al*., 2019; Gonzalez Rojo *et al* 2019, Lombó & Herráez *et al*., 2021). Zhang e colaboradores (2022), demonstraram que a exposição paterna de zebrafish a 10 µg/L de BPAF foi capaz de afetar genes de regulação epigenética, DNA e RNA metiltransferase, em testículos e ovários da geração F0 e larvas (F1) 120 hpf. Além disso, o tratamento reduziu as taxas de eclosão, aumentou a mortalidade e encurtou o comprimento corporal das larvas F1.

A embriogênese dos peixes é amplamente reconhecida como o período mais suscetível aos efeitos de contaminantes ambientais, como os EDCs, sendo frequentemente escolhida como janela para avaliações de toxicidade (Naderi *et al*., 2014; Gyimah *et al*, 2021). Durante esse

período crítico de desenvolvimento, a vulnerabilidade a estressores ambientais é exacerbada, podendo interromper a homeostase das vias fisiológicas e resultar em distúrbios fenotípicos persistentes ao longo da vida do organismo (Hanson & Gluckman, 2014; Gyima et al., 2021). A exposição direta de embriões/larvas com BPAF por 4 dias, teve resultado similar, mas em menor intensidade, ao observado para as larvas F1. A exposição direta levou a um atraso na eclosão das larvas em 72h, não alteração de desenvolvimento e queda de sobrevivência ao longo do período avaliado.

Moreman e colaboradores (2017); Mu e colaboradores (2018) e Gao e colaboradores (2022) determinaram através da taxa de letalidade que o BPAF é o bisfenol alternativo ao BPA mais tóxico para a sobrevivência dos embriões/larvas de zebrafish, sendo mais tóxico que o próprio BPA. Segue o ranking de letalidade (do mais tóxico para o menos tóxico) BPAF > BPA > BPF > BPS (Moreman *et al*., 2017), BPAF > BPA > BPF > BPS (Mu *et al*., 2018) e BPAP ≈ BPAF > BPC > BPB > BPA > BPE > BPF (Gao *et al*., 2022). Além disso, em larvas de zebrafish diretamente expostas a 100 e 200 μg/L por 96h (Meng *et al*., 2023), 100 e 1000 μg/L por 5 dias (Zhang *et al*., 2022) e 500 μg/L por 96h (Rao *et al*., 2022), ocorreu redução de eclosão, alteração de desenvolvimento e aumento de mortalidade. Porém, as altas concentrações citadas acima são relativamente próximas as concentrações letais médias (LC_{50} = 1, 16 mg/L) (Gao *et al*., 2022), (LC_{50} = 1,6 mg/L) (Moreman *et al*., 2017) e (LC50 = 1.95 mg/L) (Mu *et al* 2018), concentrações estas distantes de qualquer relevância ambiental (Moreman *et al*., 2017; Liu *et al*., 2017; *Liu et al*., 2021; Russo *et al*., 2021; Chen et al., 2024; Lai *et al*., 2024). Neste tocante, o presente trabalho se complementa aos anteriores (Moreman *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2022; Gao *et al*., 2022; Rao *et al*., 2022; Meng *et al*., 2023), por demonstrar que uma dose consideravelmente inferior (0,15 μg/L) e ambientalmente relevante ainda é capaz de impactar a eclosão e sobrevivência das larvas.

Ademais, avaliamos a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento, as vias estrogênicas e androgênica tanto nas larvas F1 quanto diretamente expostas ao BPAF. Os genes *vegfa* e *wnt8a* desempenham papéis cruciais em uma variedade de processos, incluindo o desenvolvimento embrionário (Gyimah *et al* 2021). O gene *vegfa* é essencial para a vasculogênese (Zhu *et al*., 2017; Chen *et al*., 2020b), enquanto o gene *wnt8* é necessário para a formação do eixo dorsal (Lekven *et al*., 2005; Hino *et al*., 2018). O gene *mstn1(*Miostatina), um membro da superfamília TGF-β é expresso em uma diversidade de tecidos em peixes teleósteos, incluindo cérebro, olhos, intestino, músculos, brânquias ovários e testículos (Rodgers *et al*., 2001; Xie *et al*., 2019).

Neste estudo, demonstramos que a exposição paterna ao BPAF interferiu na expressão do gene relacionado ao desenvolvimento *vegfa* nas larvas F1. Contudo, embora a exposição direta das larvas ao BPAF não tenha afetado o desenvolvimento, esta teve impacto substancial na expressão dos genes *mstn1*, *vegfa* e *wnt8*. É possível que os níveis de mRNA dos genes *mstn1*, *vegfa* e *wnt8* não reflitam diretamente a morfologia, mas que as alterações na expressão genica encontradas sejam decorrentes de outras ações do BPAF não analisadas, visto que estes genes estão envolvidos em diversas funções. Além disso, é possível que as análises morfológicas realizadas neste trabalho não tenham conseguido captar outras mudanças morfológicas que possam ter ocorrido, mas que não foram contempladas pelos parâmetros investigados neste trabalho.

EDCs podem afetar o desenvolvimento sexual do zebrafish, provocando feminilização ou masculinização (Santos *et al*., 2017). Há evidências de que o BPA induz feminilização durante a ontogenia gonadal em diferentes organismos (Crain *et al*., 2007). De maneira semelhante, o BPAF apresentou tendência para a feminilização durante o desenvolvimento das gônadas em organismos modelo (Mentor *et al*., 2020; Cai *et al*., 2020; Lo Nostro *et al*., 2023; Xue *et al*., 2024). Em larvas de zebrafish, o BPAF foi capaz de provocar maior estímulo da atividade estrogênica que o BPA (Song *et al*., 2014; Moreman et al., 2017; Gao *et al*., 2022). Dito isto, também quantificamos a expressão de genes utilizados para estimar atividade estrogênica nas larvas: receptor de estrógeno (*esr1*), Aromatase B (*cyp19a1b*) e vitelogenina (*vgt1*) (Schiller *et al*., 2014; Guo *et al*., 2017). Nas larvas F1, o estímulo da expressão do gene *cyp19a1b* sugere aumento da atividade estrogênica, sendo mais uma evidência do impacto intergeracional do BPAF.

Durante o desenvolvimento embrionário, hormônios endógenos, como hormônios esteroidais, desempenham papéis cruciais durante a diferenciação sexual (McLachlan (2001); Naderi *et al*., 2014). Um estudo anterior mostrou que a exposição direta a 1 e 100 µg/L de BPAF durante o período de desenvolvimento embrionário do zebrafish (120 hpf), aumentou a produção de 17-β estradiol (Qiu *et al*., 2021). Aqui, os embriões diretamente expostos ao BPAF estimularam todos os genes relacionados ao estrógeno (*esr1, cyp19a1b* e *vgt1*) avaliados. Este resultado está de acordo com estudos prévios, onde as expressões de *cyp19a1b* e *vgt1* foram estimuladas após tratamento de larvas de zebrafish com 0,05; 0,25 e 0,5 mg/L de BPAF por 120 hpf (Cano-Nicolau *et al*., 2016) e 1 µM (336 µg/L) por 7 dpf (Gao *et al*., 2022), respectivamente. Adicionalmente, os níveis de mRNA dos genes *cyp19a1b* e *vgt1* também foram estimulados

após exposição de larvas de zebrafish a 0,1 (33 µg/L); 0,5 (168 µg/L); 1 (336 µg/L) e 5 (1681 µg/L) µM de BPAF por 2 dias (Pinto *et al*., 2019)

Desta forma, mostramos que em concentração ambientalmente relevante (0,15 µg/L) e consideravelmente inferior as doses referenciadas anteriormente, o BPAF ainda manteve capacidade de induzir a expressão dos genes relacionados ao estrógeno, os quais são utilizado como biomarcadores (*cyp19a1b* e *vgt1)* para exposição a agentes estrogênicos e xenoestrogênicos (Sumpter & Jobling, 1995; Muncke & Eggen, 2006; Brion *et al*., 2012; Chow *et al*., 2013, Petersen *et al*., 2013 Schiller *et al*., 2014; Cano-Nicolau *et al*., 2016). No entanto, o forte estímulo da expressão do gene *hsd11b2*, envolvido na síntese de andrógenos, como o 11-KT (Baker *et al*., 2010, Feswick *et al*., 2014; Tovo-Neto *et al*., 2020; Fang *et al*., 2022), sugere que a exposição direta dos embriões/larvas ao BPAF, pode ter desregulado tanto a atividade estrogênica como a androgênica.

Conclusão

Este estudo revelou pela primeira vez que o BPAF é capaz de afetar a espermatogênese e a qualidade espermática do zebrafish, estimulando os cistos meióticos (espermatócitos) e pós-meióticos (espermátides), além de reduzir drasticamente a motilidade espermática. Porém, o BPAF não aumentou o número de espermatozoides, sugerindo um bloqueio no processo espermiogenico. Além disso, o estímulo dos cistos mais diferenciados não aparenta ser mediado por andrógenos, visto que o principal andrógeno em peixes, o 11-KT, não sofreu alteração significativa tanto nos níveis plasmáticos como na liberação pelos testículos. Desta forma, mecanismos ainda não identificados podem estar atuando na ação do BPAF nos cistos espermatogênicos. Este estudo encontrou evidências de efeitos intergeracionais do BPAF na informação paterna, com uma dose (0,15 µg/L) consideravelmente inferior à utilizada em estudos anteriores, resultando em um considerável atraso nas taxas de eclosão, aumento de mortalidade e modificação de expressão gênica nas larvas F1. Sugerimos que os impactos observados na F1 sejam mediados por modificações epigenéticas ocorridas nas células germinativas. Larvas diretamente expostas ao BPAF, apresentaram indício de desregulação da atividade estrogênica, estimulando tanto genes relacionados ao estrógeno como ao andrógeno. Em suma, o presente trabalho demonstra que o BPAF, em concentração ambientalmente relevante, causou danos a parâmetros reprodutivos, à viabilidade da geração F1 e às larvas diretamente expostas. Isso ressalta a importância da elucidação dos efeitos do BPAF e seus

possíveis impactos ao ecossistema, bem como a necessidade de questionarmos sua viabilidade como substituto ao BPA.

Referências

Arancio, A. L., Cole, K. D., Dominguez, A. R., Cohenour, E. R., Kadie, J., Maloney, W. C., ... & Schuh, S. M. (2019a). Bisphenol A, Bisphenol AF, di-n-butyl phthalate, and 17β-estradiol have shared and unique dose-dependent effects on early embryo cleavage divisions and development in Xenopus laevis. *Reproductive Toxicology*, *84*, 65-74.

Arancio, A. L., Cohenour, E. R., Cole, K. D., Dominguez, A. R., Kadie, J., Maloney, W. C., ... & Schuh, S. M. (2019b). Data demonstrating distinct embryonic developmental defects induced by bisphenol A alternatives. *Data in brief*, 25, 104091.

Awad, M. M. (2011). Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal reproduction science*, 123(3-4), 157-162.

Babiak, I., Marschhäuser, V., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Eggen, B., & Babiak, J. (2012). Effects of extender, storage and sperm-to-egg ratio on cryopreservation success of A tlantic cod (G adus morhua L.) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(6), 941-947.

Baker, M. (2010). 11 [beta]-hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 evolved from an ancestral 17 [beta]-hydroxysteroid dehydrogenase-type 2. *Nature Precedings*, 1-1

Batista-Silva, H., Rodrigues, K., de Moura, K. R. S., Elie, N., Van Der Kraak, G., Delalande, C., & Silva, F. R. M. B. (2022). In vivo and in vitro short-term bisphenol A exposures disrupt testicular energy metabolism and negatively impact spermatogenesis in zebrafish. *Reproductive Toxicology*, 107, 10-21.

Bhat, I. A., Dar, J. Y., Ahmad, I., Mir, I. N., Bhat, H., Bhat, R. A., ... & Sharma, R. (2021). Testicular development and spermatogenesis in fish: Insights into molecular aspects and regulation of gene expression by different exogenous factors. *Reviews in Aquaculture*, *13*(4), 2142-2168.

Boychenko, S., Egorova, V. S., Brovin, A., & Egorov, A. D. (2024). White-to-Beige and Back: Adipocyte Conversion and Transcriptional Reprogramming. *Pharmaceuticals*, *17*(6), 790.

Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Tong, S. K., Chung, B. C., & Kah, O. (2012). Brain aromatase (Cyp19a1b) is a highly sensitive gene to estrogens and xeno-estrogens. In *Endocrine Disruptors 2012* (p. NC). Smithers. Shropshire.

Cai, M., Li, Y. Y., Zhu, M., Li, J. B., & Qin, Z. F. (2020). Evaluation of the effects of low concentrations of bisphenol AF on gonadal development using the Xenopus laevis model: A finding of testicular differentiation inhibition coupled with feminization. *Environmental Pollution*, 260, 113980.

Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T. D., Kah, O., & Coumailleau, P. (2016). Estrogenic effects of several BPA analogs in the developing zebrafish brain. *Frontiers in neuroscience*, 10, 187322.

Carnevali, O., Santangeli, S., Forner-Piquer, I., Basili, D., & Maradonna, F. (2018). Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish gametes?. *Fish physiology and biochemistry*, 44, 1561-1576.

Castro, J.D.S., Santos, F. B. P., da Costa, J. C., Heinrichs-Caldas, W., & Val, A. L. (2024). In vivo exposure to high temperature compromises quality of the sperm in Colossoma macropomum. *Animal Reproduction Science*, 262, 107412.

Cavaco, J. E. B., Bogerd, J., Goos, H., & Schulz, R. W. (2001). Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (Clarias gariepinus). *Biology of Reproduction*, 65(6), 1807-1812.

Cavaco, J. E. B., Vilrokx, C., Trudeau, V. L., Schulz, R. W., & Goos, H. J. (1998). Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (Clarias gariepinus). *American Journal of Physiology-Regulatory*, *Integrative and Comparative Physiology*, 275(6), R1793-R1802.

Česen, M., Ahel, M., Terzić, S., Heath, D. J., & Heath, E. (2019). The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. *Science of the total environment*, 650, 2446-2453.

Champroux, A., Cocquet, J., Henry-Berger, J., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2018). A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: paternal epigenetic and transgenerational inheritance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* 6, 50.

Chen, P., Zhong, Y., Chen, K., Guo, C., Gong, J., Wang, D., ... & Yu, Y. (2020a). The impact of discharge reduction activities on the occurrence of contaminants of emerging concern in surface water from the Pearl River. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 30378-30389.

Chen, G., Wang, L., Li, W., Zhang, Q., & Hu, T. (2020b). Nodularin induced oxidative stress contributes to developmental toxicity in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 194, 110444.

Chen, J., Saili, K. S., Liu, Y., Li, L., Zhao, Y., Jia, Y., ... & Huang, C. (2017). Developmental bisphenol A exposure impairs sperm function and reproduction in zebrafish. *Chemosphere*, 169, 262-270.

Chen, Z., Zhang, G., Xie, M., Zheng, Z., Chen, Y., Zhang, N., ... & Dong, Z. (2024). Toxic effects of environmental concentration Bisphenol AF exposure on the survival, growth and reproduction of adult male Oryzias curvinotus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *280*, 109903.

Chow, W. S., Chan, W. K. L., & Chan, K. M. (2013). Toxicity assessment and vitellogenin expression in zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae acutely exposed to bisphenol A, endosulfan, heptachlor, methoxychlor and tetrabromobisphenol A. *Journal of Applied Toxicology*, 33(7), 670-678.

CONCEA, C. (2023). Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*.

Costa, D. F., de Oliveira Ribeiro, A., Ricci, J. M. B., da Silva Rodrigues, M., de Oliveira, M. A., da Rosa, I. F., ... & Nóbrega, R. H. (2024). A83-01 and DMH1 effects in the zebrafish spermatogonial niche: Unraveling the roles of TGF-β and BMP signaling in the Fsh-mediated spermatogonial fate. *Gene,* 897, 148082.

Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette Jr, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive toxicology*, 24(2), 225-239.

Crespo, D., Assis, L. H., Van De Kant, H. J., De Waard, S., Safian, D., Lemos, M. S., ... & Schulz, R. W. (2019). Endocrine and local signaling interact to regulate spermatogenesis in zebrafish: follicle-stimulating hormone, retinoic acid and androgens. D*evelopment*, 146(21), dev178665.

Czarny-Krzymińska, K., Krawczyk, B., & Szczukocki, D. (2023). Bisphenol A and its substitutes in the aquatic environment: Occurrence and toxicity assessment. *Chemosphere*, *315*, 137763.

Dai, W., He, Q. Z., Zhu, B. Q., & Zeng, H. C. (2021). Oxidative stress-mediated apoptosis is involved in bisphenol S-induced reproductive toxicity in male C57BL/6 mice. *Journal of Applied Toxicology*, 41(11), 1839-1851.

De Waal, P. P., Wang, D. S., Nijenhuis, W. A., Schulz, R. W., & Bogerd, J. (2008). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (Danio rerio) testis. *Reproduction*, 136(2), 225.

Faheem, M., & Bhandari, R. K. (2021). Detrimental effects of bisphenol compounds on physiology and reproduction in fish: a literature review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81, 103497.

Fallah, H. P., Tovo-Neto, A., Yeung, E. C., Nóbrega, R. H., & Habibi, H. R. (2019). Paracrine/autocrine control of spermatogenesis by gonadotropin-inhibitory hormone. *Molecular and cellular endocrinology*, 492, 110440.

Fallah, H. P., Rodrigues, M. S., Zanardini, M., Nóbrega, R. H., & Habibi, H. R. (2021). Effects of gonadotropin-inhibitory hormone on early and late stages of spermatogenesis in ex-vivo culture of zebrafish testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *520*, 111087.

Feng, Y., Yin, J., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., & Shao, B. (2012). Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicology letters*, *211*(2), 201-209.

Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., & Shao, B. (2016). Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 147, 9-19.

Fang, Z., Li, X., Wang, Y., Lu, W., Hou, J., & Cheng, J. (2022). Steroidogenic Effects of Salinity Change on the Hypothalamus–Pituitary–Gonad (HPG) Axis of Male Chinese Sea Bass (Lateolabrax maculatus). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10905.

Feswick, A., Ings, J. S., Doyle, M. A., Bosker, T., Munkittrick, K. R., & Martyniuk, C. J. (2014). Transcriptomics profiling and steroid production in mummichog (Fundulus heteroclitus) testes after treatment with 5α-dihydrotestosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 203, 106-119.

Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Smułek, W., & Grześkowiak, T. (2020). Removal of bisphenol A and its potential substitutes by biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191, 1100-1110.

Gao, Y., Li, A., Zhang, W., Pang, S., Liang, Y., & Song, M. (2022). Assessing the toxicity of bisphenol A and its six alternatives on zebrafish embryo/larvae. *Aquatic Toxicology*, 246, 106154.

Gao, Y., Xiao, S. K., Wu, Q., & Pan, C. G. (2023). Bisphenol analogues in water and sediment from the Beibu Gulf, South China Sea: Occurrence, partitioning and risk assessment. *Science of the Total Environment*, *857*, 159445.

García-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R. H., de Waal, P. P., van Dijk, W., Hemrika, W., ... & Schulz, R. W. (2010). Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology*, 151(5), 2349-2360.

González-Rojo, S., Lombó, M., Fernández-Díez, C., & Herráez, M. P. (2019). Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, 248, 368-379.

Graham, J. K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal reproduction science*, 68(3-4), 239-247.

Gu, J., Guo, M., Yin, X., Huang, C., Qian, L., Zhou, L., ... & Ji, G. (2022). A systematic comparison of neurotoxicity of bisphenol A and its derivatives in zebrafish. *Science of the Total Environment*, 805, 150210.

Guo, D., Wang, Y., Qian, Y., Chen, C., Jiao, B., Cai, L., & Wang, Q. (2017). Joint acute and endocrine disruptive toxicities of malathion, cypermethrin and prochloraz to embryo-larval zebrafish, Danio rerio. *Chemosphere*, 166, 63-71.

Gyimah, E., Xu, H., Dong, X., Qiu, X., Zhang, Z., Bu, Y., & Akoto, O. (2021). Developmental neurotoxicity of low concentrations of bisphenol A and S exposure in zebrafish. *Chemosphere*, 262, 128045.

Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. (2014). Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?. *Physiological reviews*, 94(4), 1027-1076.

Hatef, A., Alavi, S. M. H., Golshan, M., & Linhart, O. (2013). Toxicity of environmental contaminants to fish spermatozoa function in vitro—A review. *Aquatic toxicology*, 140, 134-144.

Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A. K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., ... & Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *European journal of cell biology,* 79(12), 950-960.

Hidayatullah, P., Mengko, T. L., Munir, R., & Barlian, A. (2021). Bull sperm tracking and machine learning-based motility classification. *IEEE Access*, 9, 61159-61170.

Hinfray, N., Nobrega, R. H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Marechal, E., Chadili, E., ... & Brion, F. (2013). Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *J Endocrinol*, 216(3), 375-88.

Hino, H., Nakanishi, A., Seki, R., Aoki, T., Yamaha, E., Kawahara, A., ... & Hibi, M. (2018). Roles of maternal wnt8a transcripts in axis formation in zebrafish. *Developmental Biology*, 434(1), 96-107.

Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., & Mathur, P. P. (2016). Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. In Seminars in cell & developmental biology (Vol. 59, pp. 126-140). *Academic Press*.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, 47(15), 8793-8800.

Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of biomedical research*, 27(2), 135.

Jin, H., & Zhu, L. (2016). Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China. *Water research*, 103, 343-351.

Jin, H., Zhu, J., Chen, Z., Hong, Y., & Cai, Z. (2018). Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in adults' blood from China. *Environmental science & technology*, *52*(2), 812-820.

Jin, H., Xie, J., Mao, L., Zhao, M., Bai, X., Wen, J., ... & Wu, P. (2020). Bisphenol analogue concentrations in human breast milk and their associations with postnatal infant growth. *Environmental Pollution*, *259*, 113779.

Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews genetics*, 8(4), 253-262.

Kamei, H., Kawazoe, I., Kaneko, T., & Aida, K. (2005). Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, Anguilla japonica, and its biochemical properties and steroidogenic activities. *General and comparative endocrinology*, *143*(3), 257-266.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., ... & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, 84(2), 249-259.

Kowalski, R. K., & Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94-108.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, Salmo trutta f. fario. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 213-224.

Lai, K., Zhang, L., & Xu, J. (2024). Evaluation of the chronic toxicity of bisphenol A and bisphenol AF to sea cucumber Apostichopus japonicus after long-term single and combined exposure at environmental relevant concentration. *Environmental Research*, 251, 118748.

Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2009a). Histological and stereological evaluation of zebrafish (Danio rerio) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of reproduction*, 81(1), 177-187.

Leal, M. C., de Waal, P. P., García-López, Á., Chen, S. X., Bogerd, J., & Schulz, R. W. (2009b). Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo. *General and comparative endocrinology*, 162(2), 134-138.

Lekven, A. C., Thorpe, C. J., Waxman, J. S., & Moon, R. T. (2001). Zebrafish wnt8 encodes two wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Developmental cell*, 1(1), 103-114.

Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., & Korach, K. S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environmental health perspectives*, 120(7), 1029-1035.

Li, A., Zhuang, T., Shi, W., Liang, Y., Liao, C., Song, M., & Jiang, G. (2020a). Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China. *Science of the total environment*, 707, 136100.

Li, R., Liu, S., Qiu, W., Yang, F., Zheng, Y., Xiong, Y., ... & Zheng, C. (2020b). Transcriptomic analysis of bisphenol AF on early growth and development of zebrafish (Danio rerio) larvae. *Environmental Science and Ecotechnology*, *4*, 100054.

Li, Y., Xiong, Y., Lv, L., Li, X., & Qin, Z. (2022). Effects of low-dose bisphenol AF on mammal testis development via complex mechanisms: alterations are detectable in both infancy and adulthood. *Archives of toxicology*, *96*(12), 3373-3383.

Liang, S., Yin, L., Shengyang Yu, K., Hofmann, M. C., & Yu, X. (2017). High-content analysis provides mechanistic insights into the testicular toxicity of bisphenol A and selected analogues in mouse spermatogonial cells. *Toxicological sciences*, 155(1), 43-60.

Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., ... & Zhou, Z. (2013). Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell death & disease*, 4(6), e676-e676.

Liu, Y., Zhang, S., Song, N., Guo, R., Chen, M., Mai, D., ... & Chen, J. (2017). Occurrence, distribution and sources of bisphenol analogues in a shallow Chinese freshwater lake (Taihu Lake): Implications for ecological and human health risk. *Science of the Total Environment*, *599*, 1090-1098.

Liu, J., Zhang, L., Lu, G., Jiang, R., Yan, Z., & Li, Y. (2021). Occurrence, toxicity and ecological risk of Bisphenol A analogues in aquatic environment–A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111481.

Lo Nostro, F. L; Costa, D. F; Nóbrega, R. H; Da Cuña, R (2023). EDCs: focus on male fish reproductive alterations. *Environmental Contaminants And Endocrine Health***,** [S.L.], p. 269-281.

Lombó, M., & Herráez, M. P. (2021). Paternal inheritance of bisphenol A cardiotoxic effects: the implications of sperm epigenome. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2125.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Navarro, C., Robles, V., & Herráez, M. P. (2015). Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure. *Environmental pollution*, 206, 667-678.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., & Herráez, M. P. (2019). Genetic and epigenetic alterations induced by bisphenol A exposure during different periods of spermatogenesis: from spermatozoa to the progeny. *Scientific Reports*, 9(1), 18029.

Ma, Y., Han, J., Guo, Y., Lam, P. K., Wu, R. S., Giesy, J. P., ... & Zhou, B. (2012). Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in in vivo assay in zebrafish by 2, 4-dichlorophenol. *Aquatic toxicology*, 106, 173-181.

McLachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine reviews*, *22*(3), 319-341.

Meng, X., Su, S., Wei, X., Wang, S., Guo, T., Li, J., ... & Wang, Z. (2023). Exposure to bisphenol A alternatives bisphenol AF and fluorene-9-bisphenol induces gonadal injuries in male zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114634.

Mentor, A., Wänn, M., Brunström, B., Jönsson, M., & Mattsson, A. (2020). Bisphenol AF and bisphenol F induce similar feminizing effects in chicken embryo testis as bisphenol A. *Toxicological Sciences*, *178*(2), 239-250.

Miller, D., & Ostermeier, G. C. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human reproduction update*, 12(6), 757-767.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (Anguilla japonica). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5774-5778.

Miura, T., & Miura, C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish physiology and biochemistry,* 28, 181-186.

Morais, R. D. V. S., Nóbrega, R. H., Gómez-González, N. E., Schmidt, R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2013). Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (Danio rerio) testis. *Endocrinology*, 154(11), 4365-4376.

Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., & Tyler, C. R. (2017). Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environmental science & technology*, 51(21), 12796-12805.

Mostari, M. H., Rahaman, M. M., Akhter, M. A., Ali, M. H., Sasanami, T., & Tokumoto, T. (2022). Transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues and sperm motility. *Reproductive Toxicology*, 109, 31-38.

Mu, X., Huang, Y., Li, X., Lei, Y., Teng, M., Li, X., ... & Li, Y. (2018). Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. *Environmental science & technology*, 52(5), 3222-3231.

Muncke, J., & Eggen, R. I. (2006). Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (Danio rerio). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *25*(10), 2734-2741.

Naderi, M., Wong, M. Y., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*, 148, 195-203.

Nguyen, M., Sabry, R., Davis, O. S., & Favetta, L. A. (2022). Effects of BPA, BPS, and BPF on oxidative stress and antioxidant enzyme expression in bovine oocytes and spermatozoa. *Genes*, 13(1), 142.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., & Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PloS one*, 5(9), e12808.

Nowicka-Bauer, K., & Nixon, B. (2020). Molecular changes induced by oxidative stress that impair human sperm motility. *Antioxidants*, 9(2), 134.

OECD, T. N. (2013). 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section*, 2, 1-22.

Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., & Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, Anguilla japonica. *Biology of Reproduction*, 77(6), 970-977.

Okazaki, H., Hirao-Suzuki, M., Takeda, S., Takemoto, Y., Mizunoe, R., Haraguchi, K., ... & Aramaki, H. (2018). Bisphenol AF as an activator of human estrogen receptor β1 (ERβ1) in breast cancer cell lines. *The Journal of toxicological sciences*, *43*(5), 321-327.

Pan, Y., Deng, M., Li, J., Du, B., Lan, S., Liang, X., & Zeng, L. (2020). Occurrence and maternal transfer of multiple bisphenols, including an emerging derivative with unexpectedly high concentrations, in the human maternal–fetal–placental unit. *Environmental science & technology*, *54*(6), 3476-3486.

Petersen, K., Fetter, E., Kah, O., Brion, F., Scholz, S., & Tollefsen, K. E. (2013). Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquatic toxicology*, *138*, 88-97.

Pinto, C., Hao, R., Grimaldi, M., Thrikawala, S., Boulahtouf, A., Ait-Aissa, S., ... & Bondesson, M. (2019). Differential activity of BPA, BPAF and BPC on zebrafish estrogen receptors in vitro and in vivo. *Toxicology and applied pharmacology*, *380*, 114709.

Qiu, W., Fang, M., Magnuson, J. T., Greer, J. B., Chen, Q., Zheng, Y., ... & Schlenk, D. (2020). Maternal exposure to environmental antibiotic mixture during gravid period predicts gastrointestinal effects in zebrafish offspring. *Journal of Hazardous Materials*, *399*, 123009.

Qiu, W., Liu, S., Chen, H., Luo, S., Xiong, Y., Wang, X., ... & Wang, K. J. (2021). The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms. *Journal of hazardous materials*, 406, 124303.

Rao, C., Cao, X., Li, L., Zhou, J., Sun, D., Li, B., ... & Chen, J. (2022). Bisphenol AF induces multiple behavioral and biochemical changes in zebrafish (Danio rerio) at different life stages. *Aquatic Toxicology*, *253*, 106345.

Reis, L. D. P. G., Lora-Benítez, A. J., Molina-López, A. M., Mora-Medina, R., Ayala-Soldado, N., & Moyano-Salvago, M. D. R. (2022). Evaluation of the toxicity of bisphenol A in reproduction and its effect on fertility and embryonic development in the Zebrafish (Danio rerio). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(2), 962.

Rifa, R. A., & Lavado, R. (2023). Unveiling the next generation of bisphenol analogs and their impact on human health using in vitro methods. *Emerging Contaminants*, 100296.

Rocha, B. A., Da Costa, B. R. B., De Albuquerque, N. C. P., De Oliveira, A. R. M., Souza, J. M. O., Al-Tameemi, M., ... & Barbosa Jr, F. (2016). A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, *154*, 511-519.

Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., & Levine, M. A. (2001). Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: Oreochromis mossambicus and Morone chrysops. *Endocrinology*, 142(4), 1412-1418.

Rodrigues, M. S., Fallah, H. P., Zanardini, M., Malafaia, G., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2021). Interaction between thyroid hormones and gonadotropin inhibitory hormone in ex vivo culture of zebrafish testis: An approach to study multifactorial control of spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 532, 111331.

Rodrigues, M. S., Tovo-Neto, A., Rosa, I. F., Doretto, L. B., Fallah, H. P., Habibi, H. R., & Nóbrega, R. H. (2022). Thyroid hormones deficiency impairs male germ cell development: a cross talk between hypothalamic-Pituitary-thyroid, and—gonadal axes in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 865948.

Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1-4), 1-28.

Russo, G., Laneri, S., Di Lorenzo, R., Ferrara, L., & Grumetto, L. (2021). The occurrence of selected endocrine-disrupting chemicals in water and sediments from an urban lagoon in Southern Italy. *Water Environment Research*, 93(10), 1944-1958.

Russo, G., Laneri, S., Di Lorenzo, R., Neri, I., Dini, I., Ciampaglia, R., & Grumetto, L. (2022). Monitoring of pollutants content in bottled and tap drinking water in Italy. *Molecules*, *27*(13), 3990.

Sahu, A., & Verma, R. (2023). Bisphenol S dysregulates thyroid hormone homeostasis; Testicular survival, redox and metabolic status: Ameliorative actions of melatonin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 104, 104300.

Saito, K., Siegfried, K. R., Nüsslein-Volhard, C., & Sakai, N. (2011). Isolation and cytogenetic characterization of zebrafish meiotic prophase I mutants. *Developmental Dynamics*, 240(7), 1779-1792.

Santos, D., Luzio, A., & Coimbra, A. M. (2017). Zebrafish sex differentiation and gonad development: a review on the impact of environmental factors. *Aquatic toxicology*, 191, 141-163.

Schagdarsurengin, U., & Steger, K. (2016). Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nature Reviews Urology*, 13(10), 584-595.

Schiller, V., Zhang, X., Hecker, M., Schäfers, C., Fischer, R., & Fenske, M. (2014). Species-specific considerations in using the fish embryo test as an alternative to identify endocrine disruption. *Aquatic toxicology*, 155, 62-72.

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.

Shaliutina, O., Materiienko, A., Shaliutina-Kolešová, A., & Gazo, I. (2021). Using fish spermatozoa in in vitro toxicity tests: A potential toxicology tool. *Aquaculture*, 539, 736647.

Shi, J., Jiao, Z., Zheng, S., Li, M., Zhang, J., Feng, Y., ... & Shao, B. (2015). Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (Danio rerio), and the impact on offspring. *Chemosphere*, 128, 252-257.

Shi, G., Guo, H., Sheng, N., Cui, Q., Pan, Y., Wang, J., ... & Dai, J. (2018). Two-generational reproductive toxicity assessment of 6: 2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate (F-53B, a novel alternative to perfluorooctane sulfonate) in zebrafish. *Environmental Pollution*, *243*, 1517-1527.

Silveira, C. R., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Soares, S. L., Anciuti, A. N., Kütter, M. T., & Martínez, P. E. (2019). Effects of Bisphenol A on redox balance in red blood and sperm cells and spermatic quality in zebrafish Danio rerio. *Ecotoxicology*, 28, 913-922.

Skaar, K. S., Nobrega, R. H., Magaraki, A., Olsen, L. C., Schulz, R. W., & Male, R. (2011). Proteolytically activated, recombinant anti-Müllerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology*, 152(9), 3527-3540.

Sohoni, P. C. R. T., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., ... & Sumpter, J. P. (2001). Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (Pimephales promelas). *Environmental science & technology*, 35(14), 2917-2925.

Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., & Jiang, G. (2014). Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere*, *112*, 275-281.

Strazzullo, M., & Rosaria Matarazzo, M. (2017). Epigenetic effects of environmental chemicals on reproductive biology. *Current Drug Targets*, 18(10), 1116-1124.

Sumpter, J. P., & Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental health perspectives*, 103(suppl 7), 173-178.

Tong, S. K., & Chung, B. C. (2003). Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 86(3-5), 381-386.

Torres-Badia, M., Martin-Hidalgo, D., Serrano, R., Garcia-Marin, L. J., & Bragado, M. J. (2023). Bisphenol S reduces pig spermatozoa motility through different intracellular pathways and mechanisms than its analog bisphenol A. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9598.

Tovo-Neto, A., Martinez, E. R., Melo, A. G., Doretto, L. B., Butzge, A. J., Rodrigues, M. S., ... & Nóbrega, R. H. (2020). Cortisol directly stimulates spermatogonial differentiation, meiosis, and spermiogenesis in zebrafish (Danio rerio) testicular explants. *Biomolecules*, 10(3), 429.

Valcarce, D. G., Vuelta, E., Robles, V., & Herráez, M. P. (2017). Paternal exposure to environmental 17-alpha-ethinylestradiol concentrations modifies testicular transcription, affecting the sperm transcript content and the offspring performance in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, *193*, 18-29.

Vigier, M., Weiss, M., Perrard, M. H., Godet, M., & Durand, P. (2004). The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. *Journal of Molecular Endocrinology*, *33*(3), 729-742.

Walker, W. H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1546), 1557-1569.

Walker, W. H. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, *1*(2), 116-120.

Wang, H., Zhou, Z., Xu, M., Li, J., Xiao, J., Xu, Z. Y., & Sha, J. (2004). A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine*, 82, 317-324.

Wu, D., Huang, C. J., Jiao, X. F., Ding, Z. M., Zhang, S. X., Miao, Y. L., & Huo, L. J. (2019). Bisphenol AF compromises blood-testis barrier integrity and sperm quality in mice. *Chemosphere*, 237, 124410.

Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., & Wang, Y. (2016). Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget*, 7(9), 10606.

Xie, S., Zhou, A., Feng, Y., Wang, Z., Fan, L., Zhang, Y., ... & Zou, J. (2019). Effects of fasting and re-feeding on mstn and mstnb genes expressions in Cranoglanis bouderius. *Gene*, 682, 1-12.

Xie, J., Zhao, N., Zhang, Y., Hu, H., Zhao, M., & Jin, H. (2022). Occurrence and partitioning of bisphenol analogues, triclocarban, and triclosan in seawater and sediment from East China Sea. *Chemosphere*, *287*, 132218.

Xue, S., Liu, L., Dong, M., Xue, W., Zhou, S., Li, X., ... & Yan, W. (2023). Prenatal exposure to bisphenol AF induced male offspring reproductive dysfunction by triggering testicular innate and adaptive immune responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 259, 115030.

Xue, S., Li, X., Zhou, S., Zhang, J., Sun, K., Peng, X., ... & Yan, W. (2024). Effects and mechanisms of endocrine disruptor bisphenol AF on male reproductive health: A mini review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *276*, 116300.

Yang, Y., Guan, J., Yin, J., Shao, B., & Li, H. (2014a). Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, *112*, 481-486.

Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., & Shao, B. (2014b). Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1328*, 26-34.

Yang, X., Liu, Y., Li, J., Chen, M., Peng, D., Liang, Y., ... & Jiang, G. (2016). Exposure to Bisphenol AF disrupts sex hormone levels and vitellogenin expression in zebrafish. *Environmental toxicology*, *31*(3), 285-294.

Yang, T., Wang, L., Liu, Y., Huang, Z., He, H., Wang, X., ... & Ma, J. (2019). Comparative study on ferrate oxidation of BPS and BPAF: Kinetics, reaction mechanism, and the improvement on their biodegradability. *Water research*, 148, 115-125.

Yu, Y., Hou, Y., Dang, Y., Zhu, X., Li, Z., Chen, H., ... & Hu, G. (2021). Exposure of adult zebrafish (Danio rerio) to Tetrabromobisphenol A causes neurotoxicity in larval offspring, an adverse transgenerational effect. *Journal of Hazardous Materials*, *414*, 125408.

Yu, Y., Xin, X., Ma, F., Li, X., Wang, Y., Zhu, Q., ... & Ge, R. S. (2022). Bisphenol AF blocks Leydig cell regeneration from stem cells in male rats. *Environmental Pollution*, *298*, 118825.

Zhang, L., Lv, J., Xu, T., Yang, L., Jiang, X., & Li, Q. (2013). High efficiency removal and recovery of an endocrine disrupting compound–bisphenol AF from wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 116, 145-153.

Zhang, Y., Li, T., Pan, C., Khan, I. A., Chen, Z., Yue, Y., & Yang, M. (2022). Intergenerational toxic effects of parental exposure to bisphenol AF on offspring and epigenetic modulations in zebrafish. *Science of The Total Environment*, 823, 153714.

Zhang, Y., Wang, B., Sun, W., Wang, G., Liu, Z., Zhang, X., ... & Zhang, H. (2024). Paternal exposures to endocrine-disrupting chemicals induce intergenerational epigenetic influences on offspring: A review. *Environment International*, 108689.

Zhao, X., Zhang, H., Chen, Z. L., Wang, X. C., & Shen, J. M. (2020). Spatial and temporal distributions of bisphenol analogues in water and sediment from the Lanzhou section of the Yellow River, China. *Arabian Journal of Geosciences*, *13*, 1-8.

Zheng, Q., Xiao, H., Shi, H., Wang, T., Sun, L., Tao, W., ... & Wang, D. (2020). Loss of Cyp11c1 causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *Journal of Endocrinology*, 244(3), 487-499.

Zhu, L., Wang, M., Fu, S., Li, K., Liu, J., & Wang, Z. (2022). BPA disrupted the testis testosterone levels by interfering ER enrichments within StAR 5′ flanking region in rare minnow Gobiocypris rarus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 257, 109338.

Conclusão Geral

Neste estudo, demonstramos que tanto o BPS como o BPAF foram capazes de afetar a espermatogênese *ex vivo* e *in vivo*, modificando os cistos meióticos (Spc) e pós-meióticos (Spt) e modulando a expressão de genes marcadores da linhagem germinativa, esteroidogênese e genes de regulação epigenética. Nos explantes testiculares, nossos resultados apontaram para efeitos do BPS e do BPAF à espermatogênese de forma não monotônica. De forma inédita, um efeito androgênico do BPS em peixes foi relatado, elevando o 11-KT e estimulando de forma anormal a produção de espermatozoides. No entanto, este impacto não se refletiu na qualidade espermática e na viabilidade dos embriões, que foram prejudicados. O BPAF não desregulou a produção de 11-KT e de espermatozoides. No entanto, modificou a proporção de cistos meióticos e pós-meióticos. Tanto BPS como BPAF mostraram evidências de efeitos intergeracionais nas larvas F1, tendo em comum, atraso nas taxas de eclosão, aumento de mortalidade e modificação da expressão gênica. Além disso, BPS e BPAF afetaram as larvas diretamente expostas, estimulando a expressão de genes de desenvolvimento e marcadores de atividade estrogênica. Vale ressaltar, que o BPS e BPAF foram avaliados em concentrações ambientalmente relevantes diferentes, não tendo o presente estudo qualquer pretensão comparativa entre ambos. Por fim, o presente trabalho questiona a viabilidade dos análogos BPS e BPAF como alternativas ao uso do BPA, se alinhando a evidências anteriores que apontam ambos como escolhas não confiáveis; este estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos do BPS e BPAF em peixes, contribuindo para a compreensão dos impactos desses compostos e reduzindo a escassez de dados neste grupo de animais.

Apêndice

CHAPTER

3.2.4

EDCs: Focus on male fish reproductive alterations

Fabiana Laura Lo Nostro[a], *Daniel Fernandes da Costa*[b], *Rafael Nóbrega*[b], *and Rodrigo Da Cuña*[a]

[a]Ecotoxicologia Acuática, DBBE, FCEN, Universidad de Buenos Aires & IBBEA, CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina

[b]Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brazil

1 Introduction

Over the past several decades, reproductive disorders related to environmental contaminants have been increasingly observed worldwide in both wildlife and humans. Chemicals that can act as endocrine disruptors are of special concern since they can alter endocrine pathways, including those that control reproduction [1]. A contaminant can be classified as an endocrine-disrupting chemical (EDC) if it acts at the cellular or molecular level by either interacting with activating or antagonizing hormone receptors, altering hormone receptor expression, altering signal transduction in hormone-responsive cells, inducing epigenetic modifications in hormone-producing or hormone-responsive cells, or modifying hormone synthesis, distribution, circulating levels, transport across membranes or metabolism [2]. Hundreds of natural or man-made chemicals fit these criteria and are known or suspected to interfere with physiological and endocrinological regulation of reproduction. Consequently, EDCs likely affect all hormonal systems that control the development and function of reproductive organs [3] (Fig. 1).

2 Male fish reproductive endocrinology

The reproductive axis in all vertebrates shares the same main regulatory components, including neurosecretory neurons in the hypothalamus that regulate the release of gonadotropin hormones (GTHs)—follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)—from the pituitary gland, which in turn control gonadal development, gametogenesis, and steroidogenesis [4].

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is one of the key players in controlling GTHs synthesis and release from gonadotrophs in the adenohypophysis. Most teleost fish possess three GnRH variants, being GnRH1 the main hypophysiotropic form as evidenced by intense direct innervation of gonadotrophs, whereas the other two variants—GnRH2 and GnRH3—show a wider distribution throughout the brain. In addition to GnRH stimulation, neuroendocrine control of GTH secretion in teleosts appears to be regulated by dopamine (DA) inhibition [5]. Neurons that produce the catecholamine DA are located in the medial preoptic area (POA) of the hypothalamus and directly innervate gonadotrophs at the adenohypophysis [6–8].

In mammals, GnRH1 is released in a pulsatile fashion, and the frequency of pulses is responsible for favoring either FSH or LH release. The evidence so far suggests that similar GnRH pulsatile release in teleosts is unlikely [9] and fine-tuning in GTH release is achieved directly at the gonadotrophs level by a variety of inputs from multiple neurons [10], including neuropeptide Y (NPY), g-aminobutyric acid (GABA), and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). Fish NPY is not only involved in reproduction but has also been shown to stimulate GH1 [11] and act as an orexigenic factor [12], potentially linking the growth, feeding, and reproductive axes. Both GnRH release stimulation and DA release inhibition have been linked to GABA, resulting in increased LH secretion in fish; however, this effect could in part be

Copyright © 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

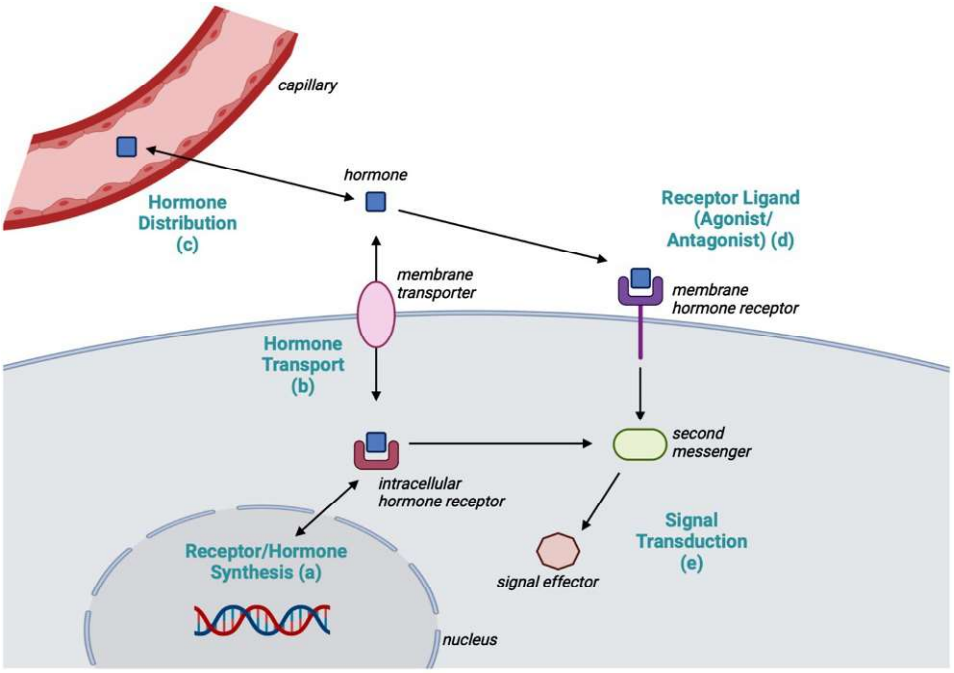


FIG. 1 Schematic diagram of some of the ways in which EDCs can interfere with hormone regulation and action. In endocrine cells, EDCs can alter hormone synthesis (A) and/or hormone release (B). Once secreted, hormone circulation and distribution (C) throughout the body can be affected by EDCs. On target cells, EDCs may influence hormone uptake (B), act as receptor ligands (D), both as agonists or antagonists, or may interfere with receptor signaling (E) or synthesis (A). Created with BioRender.com

exerted through direct innervation of gonadotrophs by GABAergic fibers as demonstrated in rainbow trout [13]. Similarly, in addition to its neuromodulatory action on GnRH, hypothalamic GnIH can directly inhibit the synthesis and release of GnRH and GTHs at the pituitary level, although its function in fish can be stimulatory or inhibitory depending on the age and/or reproductive status [14,15].

Gonadotropins in fishes have similar structural and functional characteristics as in other vertebrates. Spermatogenesis is stimulated by both FSH and LH, whereas spermiation and testicular steroidogenesis mainly involve the action of LH [16]. Spermatogenesis takes place in spermatocysts or cysts, which are formed by a cohort of Sertoli cells surrounding a single type A undifferentiated spermatogonia. Within the cyst germ cells develop synchronously due to incomplete cytokinesis [17]. Both GTHs control spermatogenesis at different stages of germ cell maturation, FSH during early stages, and LH at late stages. In the testis, FSH and LH stimulate the production of androgens and growth factors by Leydig cells, while FSH promotes the secretion of growth factors by Sertoli cells [18]. In response to GTHs, Sertoli cells also regulate the start of meiosis and spermiogenesis through 17a,20b-dihydroxy-4-pregnen-3-one [19]. In teleost, the major circulating androgens are 11-ketotestosterone (11-KT) and testosterone (T), and their levels correlate with testis size [20]. Circulating androgens maintain or induce seasonal development of ducts, accessory glands, and secondary sex traits, such as gonopodia. In addition to androgens, progestins, and estrogens, many other factors affect both plasma and testicular concentrations of steroids and may have the potential to alter spermatogenesis [21].

3 Environmental contaminants

The massive pollution that occurred during the first industrial revolution led to a significant increase in the contamination of aquatic environments by metals [22]. After the Second World War, the contamination by synthetic chemical compounds [23], such as endocrine disruptors, pesticides, and organic solvents [24], became widespread worldwide. This indiscriminate use of environmental contaminants has led to a growing concern about their adverse effects in recent decades, resulting in a variety of studies that have demonstrated their differing types and degrees of toxicity [24–26].

Over the past few decades, increasing evidence has shown that environmental contaminants can interfere with the endocrine system of wildlife and animals, leading to the creation of the term endocrine disrupting chemical or EDC. Among EDCs, plasticizers, metals, pharmaceuticals, and insecticides have drawn special attention due to their adverse effects, such as changes in the development of embryos and fetuses [27]; hormonal level changes [28], neurotoxicity [29], fertility decline [30], genotoxicity [31], among others.

4 Bisphenols

As a result of the growing global concern regarding the impacts generated by environmental contaminants, several industrial compounds began to be studied and analyzed in order to measure the damage caused to human and animal health. Thus, more and more studies have been directed to bisphenols, particularly to bisphenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane; BPA), since this compound has been used industrially on a large scale since the 50s, being detected in environmental matrices ever since [32,33].

Together with other classes of contaminants, such as synthetic hormones, phthalates, pharmaceuticals, and pesticides, bisphenols are considered contaminants of emerging concern [34,35]. Sauvé and Desrosiers [36] (2014) defined chemicals as contaminants of emerging/recent "interest or concern" (emerging contaminants) if they had been measured—or are suspected of being present—in various compartments of the environment, and their toxicity alters the metabolism of organisms.

Bisphenol A is a plastic monomer widely used for the manufacture of polycarbonate plastics, polyvinyl chloride, epoxy resins, and countless other applications [37]. Its large production volume is due to its wide use in the production of baby bottles, food storage containers, plastic bottles, laboratory equipment, sporting goods, thermal paper (cash till paper and bank boxes), household appliances, among others [38–40]. It exhibits xenoestrogenic activity and may affect a variety of physiological functions [39,41], being characterized as a partial agonist of estrogen receptors ERα and ERβ [42–44], therefore, potentially interfering with the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Studies using BPA as a contaminant have been conducted in several model organisms. Ullah et al. (2018) [45] showed in adult rats that exposure to 50 μg/L of BPA, orally, led to a reduction in sperm production and a drop in plasma concentrations of T, LH, and FSH; conversely, there was an increase in 17β-estradiol (E2) levels. In another study, mice exposed to BPA also showed reduced T synthesis [46]. Furthermore, Xie et al. (2016) [47] showed a significant increase in apoptotic germ cells when newborn rats were exposed to BPA. Paradoxically, this contaminant caused an abnormal proliferation of germ cells [47]. Effects on zebrafish (*Danio rerio*) also report harmful effects on the expression of genes involved in reproduction [48], alterations in epigenetic markers in testes culture [49], and variations in the behavior of larvae, such as anxiety [50] and neurotoxicity [51].

Regarding human health, it has been shown that BPA is present in our body. The compound was found in approximately 90% of urine samples in the US population [52]. Supornsilchai et al. [53] reported that higher concentrations of BPA in urine are directly related to cases of precocious puberty. Concerning the reproductive system, some effects have been reported, such as infertility [54], abnormalities in male genitals, with decreased seminal quality and damage to sperm DNA [55].

Bisphenols, including BPA and its analogs, can dissociate from the materials they compose, with transfer to the environment and biota [56,57]. This type of transfer can occur through the increase in temperature (thermoinstable), luminosity (photosensitive), and/or by the natural decomposition of the product over time [58–60]. Aquatic organisms, such as fish, are directly contaminated by water (bioaccumulation) from industrial processes and other anthropogenic pollutant discharge actions, and consequently, contaminate other living beings through the food chain (biomagnification) [57,61,62]. Therefore, bisphenols have characteristics that cause great concern given the continuous exposure to these compounds [57,60,62].

Bisphenol AF (4,4′-hexafluoroisopropylidene) diphenol (BPAF) is a fluorinated diphenol (where the two original methyl groups of BPA receive fluorine) primarily used as a cross-linking agent in the production of fluoropolymers and fluoroelastomers [63,64]. Fluoroelastomers are hydrocarbon polymers that have some hydrogen atoms replaced by fluorine and are widely used industrially for their resistance to high-temperature conditions and chemical products [65]. Furthermore, BPAF does not undergo degradation by bacteria due to the lack of nutrients in the compost, making it more difficult to biodegrade than BPA [66].

In this context, a concerning fact is the progressive increase in its production. In the United States, the annual production can reach 500,000 pounds (226,796 kg) [67]. Wastewater and mud samples in Xiamen (China) were collected to verify the concentration of dissolved and adsorbed BPs in these locations. Five types of BPs were widely detected, and even though BPAF was the one with the lowest concentration, it constitutes a totally resistant chemical for Wastewater treatment plants (WWTPs) [68].

In addition to being detected in the environment, BPAF has been also found in organisms [57], and, similarly to BPA and BPS, acts agonistically on ERs [67,69,70]. An in silico study showed that BPAF has greater binding potential to ERs when compared to other analyzed bisphenols (BPA, BPS, and BPF) [71]. Corroborating this study, an in vitro transactivation assay showed greater affinity of BPAF as an ER agonist (ERα and ERβ) compared to other seven types of bisphenols, including BPA [72].

As to its effects on aquatic biota, tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to 1, 10, or 100 nM BPAF (0.34, 3.36, and 33.6 mg/L) showed the inhibition of testicular differentiation and downregulation of genes related to male sex differentiation, such as *dmrt1*, *amh*, and *sox9* [73]. A similar effect was also observed in the treatment of males of *X. laevis* with E2 [73]. Altogether, these data support the notion that BPAF has a feminizing effect and impairs the formation of the male reproductive system [73].

The effects of BPAF on zebrafish embryos\larvae range from thyroid dysregulation [74] to sublethal or lethal morphological changes (pericardial edema, craniofacial abnormality) [75]. Among all the bisphenols analyzed (BPA, BPF, BPS, and BPAF), Moreman et al. [75] showed that BPAF provided greater delay in larvae hatching and higher embryo mortality, being approximately six to seven times more potent than BPA in relation to the increase in mortality rates and hatch delay. However, it is necessary to emphasize that the concentrations of BPs used in this study were not environmentally relevant.

Zebrafish embryos at 4 h post-fertilization exposed for 120 days to 25 and 125 µg/L BPAF showed a significant reduction of T [76]. In agreement with this result, males treated with the highest concentration of BPAF (125 µg/L) showed reduced expression of genes involved in steroidogenesis, especially for *cyp17a1* mRNA levels. Additionally, a decrease in male fertility was observed in this group, indicating sperm deterioration [76]. Likewise, 2-month-old male zebrafish treated with 0.05, 0.25, and 1 mg/L BPAF for 28 h showed a dose-dependent decrease in T [77]. In addition, testes exhibited Sertoli cell only phenotype at a concentration of 1 mg/L BPAF [77].

Wu et al. [78] found adverse effects on testicular structure, sperm quality, and sexual maturity of mice fed with 5, 20, and 50 mg/kg/d of BPAF for 28 consecutive days. In addition to physiological effects, BPAF compromises epigenetic inheritance through hypermethylation of H3K27m3, suggesting that BPAF can affect the epigenetic pattern in offspring. In line with this study, rats treated via ingestion with 200 mg/kg/d of BPAF for 14 days showed reduced T production and decreased expression of genes involved in its biosynthesis, such as SR-B1, StAR, P450scc, and 17 beta-HSD, accompanied by a decrease in the concentration of SR-B1, StAR, and P450scc proteins in the testes [79]. In addition, the concentration of BPAF found in testes was directly proportional to the dose administered orally, indicating the ability of BPAF to accumulate in the testes [79]. However, there is a lack of toxicological information about BPAF and its potential damage to organisms, especially in spermatogenesis and its epigenetic regulation.

5 Metals

Metals and metalloids (e.g., arsenic, cadmium, copper, and lead), which are toxic to organs such as ovaries and testes, alter hormone synthesis and therefore act as EDCs. The mode of disruption is not exclusive to a unique mechanism and is independent of direct interactions between the toxicant and an endogenous hormone receptor [80].

A variety of heavy metals and metalloids are known as inductors of "antiestrogenic"/"antiandrogenic" effects on human reproduction. Based on epidemiological studies evaluating the load in humans and its correlation with reproductive function, it has been shown that cadmium inhibits the release of FSH and LH in the anterior pituitary, and lead alters the neuroendocrine regulation of the reproductive axis in both sexes [81]. Copper (Cu) acts as a cofactor for a number of enzymes related to metabolism, affecting growth, development, and cellular function [82]. However, in excess, it can cause adverse effects on multiple endpoints, including reproductive physiology. The presence of excess Cu in the aquatic environment is mainly a result of the increasing emission of industrial effluents and from $CuSO_4$ used to control infectious diseases in fishponds [83]. In zebrafish and yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), Cu exposure reduced testicular gonadosomatic index (GSI), proportion of spermatocytes and spermatozoa, and caused testicular lesions [84,85]. Plasma levels of sexual steroids E2, T, and 11-KT were also reduced in male zebrafish exposed to Cu, possibly a result of decreased steroidogenic enzymes *cyp19b*, *3βhsd*, and *17βhsd* mRNA expression in testes [84]. In the same study, Cu also altered the expression of *gnrh* mRNA levels in brain, decreased *fshβ* and *lhβ* mRNA in the pituitary, and decreased the expressions of *fshr* and *lhr* mRNA in the testis of the Cu-exposed males, possibly due to absence of gonadotropin and evidence of possible delayed spermatogenesis and maturation. Similarly, testicular T levels were also decreased in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to Cu, leading to a decline in sperm motility and concentration [86].

Aluminum (Al) has wide applications, ranging from industry, construction, kitchen utensils, food packaging, to products for personal care and pharmaceuticals [87]. Even though it is usually associated with minerals in water and particulate matter, acidification by acid rain can increase its bioavailability to aquatic organisms [88]. When sexually mature male *Astyanax altiparanae* were exposed to Al, androgen levels (T and 11-KT) increased [89] whereas sperm concentration and motility decreased [90].

Furthermore, occupational exposures to other elements have also been associated with reproductive abnormalities, but the precise mechanisms of action for these effects have not been elucidated yet.

6 Pharmaceuticals

The study of contaminants of emerging concern such as personal care products and pharmaceuticals for human or animals has become one of the biggest concerns in environmental research. The level of prescription and consumption in recent decades has been constantly increasing, given the increase in diseases such as obesity, diabetes, depressive disorder, and different types of cancer [91].

Considering this background, these products have been designed to alter physiological functions in humans or veterinary use with the aim of healing different pathologies; however, they can also affect "non-target" organisms. In this way, they can act as endocrine disruptors and affect the functions of different endocrine glands, either by direct action or through interference in one of the pathways described for the hormones that synthesize [92–94].

The interest in these contaminants lies in the fact that a fraction of the ingested product is eliminated through the urine and the feces and continuously enters into wastewater. Several of these drugs have been found to be highly persistent in the environment, and the low efficiency in their removal in the effluent treatment plants is highlighted. Recent measurements indicate its presence in drinking water, for which great concern has been generated at the international level [95–97].

The aquatic environment continues to be a recipient of large amounts of these compounds of anthropogenic origin. Understanding their mechanisms of action (they have chemical structures not present in the biosphere and cannot be completely biodegraded by living beings) would allow us to minimize their effects.

Antidepressants relieve depression by boosting low levels of serotonin in the brain (called selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)) and prevent the reuptake of serotonin, making more of the chemical available. Antidepressant drugs, designed for human consumption, are accidentally released into the aquatic environment from sewage effluents producing paradoxical effects on nontarget species as fish, even in concentrations between 2 and 540 ng/L. [98] In these animals, it has been shown that it alters the expression and concentration of serotonin in the brain; it can increase the release of hormones related to the reproductive axis or inhibit the secretion of growth hormone; and paradoxically, it can increase or decrease estrogen production, sperm production, and androgen levels; alterations in secondary sexual characteristics have been also observed in both sexes, inducing a high cost at population level due to the loss of communication during the reproductive season. Often, human pharmaceuticals acute toxicity is nonspecific, for example, unspecific membrane toxicity by oxidative stress.

In some teleosts as *Carassius auratus* [99] and *Cichlasoma dimerus* [100,101], it has been shown that exposure to fluoxetine (FLX) produced a decreased rate of food intake and glucose levels, increased expression of releasing factor of corticotropin, decreased LH and FSH content in the pituitary, decreased expression of neuropeptide Y in the hypothalamus, and induce the presence of foam cells in the testes. Even as a response to the stress due to the presence of pollutants in the water, a differential deposition rate of melano-macrophage centers in hemolymphopoietic and reproductive organs of *C. dimerus* (nodular clusters of pigmented macrophages, implicated in homeostasis and destruction and recycling of endogenous and exogenous material) was observed.

Moreover, the growing body of literature evaluating the effects of FLX on animal behavior—which will impact on reproductive success—showed an alteration in prey capture time associated with a decrease in serotonergic activity in the brain of *Pimephales promelas* [102] as well as alterations in swimming, shoaling, and anxiety behaviors of the mosquitofish *Gambusia holbrooki* [103].

Ivermectin (IVM) is an endectocidal antiparasitic (with external and internal effect) and began to be used mainly in the control of nematodes and arthropods that affect livestock species [104]. Due to its powerful effect and broad spectrum, this drug is still used as a base treatment in its various applications (oral, injections, topical, and pour-on), practically in all species of productive, domestic animals and in human, transforming in one of the most widely used antiparasitics in the world [105].

When applied, IVM is slightly metabolized by the treated animal, and most of the administered drug is eliminated in a relatively unchanged form through the feces. The mode of action of IVM on target organisms is through the blockade of neurotransmission, interfering with neuromuscular synapses. It acts on glutamate-dependent chloride channels, producing paralysis of the pharynx, of the skeletal muscles, and finally death. In nontarget organisms such as mammals, it stimulates gamma amino butyric acid (GABA) release from neurons normally protected by the blood-brain barrier [106]. In other vertebrates such as fish, IVM can compete with and inhibit the glycoproteins that make up the aforementioned barrier, producing neurotoxicity [107]. The use of IVM in salmonid aquaculture has become a common practice, being used mainly in the control of parasitic copepods (either lice or sea lice) [106]. IVM is highly toxic to fish and extremely toxic to invertebrates. For this reason, it should be avoided to use these commercial products into bodies of water.

Thiripurasundari et al. [108] carried out a study that demonstrates neuronal degeneration and acute hepatic necrosis due to exposure to IVM at concentrations greater than 7 μg/L, using zebrafish and catlafish (*Catla catla*) as models. Oliveira et al. [109] and Domingues et al. [110] determined damage to zebrafish at various levels (behavioral, genotoxic, oxidative stress, and antioxidant response, etc.). Varó et al. [111] determined damage to oxidative stress enzymes and liver proteins related to lipid metabolism in commercial marine fish from the Mediterranean. Davies et al. [112,113] determined that the abusive use of IVM in salmonid aquaculture has lethal effects on the community of arthropods close to the rearing cages. Lozano et al. [114] used a multilevel approach to evaluate the effects of IVM in *Prochilodus lineatus* showing that environmental concentrations of IVM produced effects in biochemical/stress and behavioral endpoints (altered fish escape response tends to induce brain acetylcholinesterase activity).

From the endocrine disruption point of view in mammals, oral doses of IVM caused a decrease in tetraiodothiroxyne (T4) levels and an increase in plasma thyroid stimulating hormone (TSH) levels [115]. Few studies have analyzed endocrine-disruptive effects of IVM in fish. Ucan-Marin et al. [116] suggest that IVM is not likely to be estrogenic in Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on the absence of the phosphoglycolipoprotein vitellogenin (VTG) induction in males, normally produced in the liver by females in response to estrogens. However, IVM was associated with a small but significant decrease in the basal concentrations of plasma VTG in females, which could be due to antagonism of estrogen binding at the receptor level or other mechanisms such as impaired protein synthesis, depleted glycogen reserves, enhanced metabolism of estrogens, or depressed synthesis of E2. In *C. auratus*, Wang et al. [117] found that oral IVM exposure produced decreased GSI, alterations in T and E2 levels, and reduced viability and motility of sperm.

7 Insecticides

Agricultural pesticides can reach aquatic ecosystems during application through air drift, runoff, and/or leaching. The distribution and concentration of toxicants in the different environmental compartments will depend on their properties and the environmental parameters of the biota [118].

According to their lipophilic nature, persistent organic pollutants, including organochlorine pesticides, can bioconcentrate and biomagnify through the food chain [119]. The longer the half-life of a toxicant in the body, the greater the risk of chronic effects attributable to the toxicant [120].

The organochlorine pesticide endosulfan (ES) is widely used in agriculture despite being banned in many countries and its high toxicity to fish (median 96-h LC50 of 2.6 μg/L). In fact, GnRH and gonadotrops cell populations in fish larvae of *C. dimerus* as well as GnRH neurons in sexually differentiated juveniles were altered by ES [121,122]. Male adults of the freshwater cichlid fish *C. dimerus* exposed to ecologically relevant concentrations of waterborne ES and in vitro studies showed, prior to death, a behavior indicative of neurotoxicity. A decrease in hematological parameters suggested a state of anemia. Histological alterations observed in exposed fish included hyperplasia and blood congestion in gills; pyknotic nuclei and hydropic degeneration in liver; and testicular damage. In vitro, although GnRH distribution was not altered, FSH pituitary content was reduced upon ES addition. A concomitant decrease in Sertoli cell activity, as indicated by γGT activity, was also observed under subchronic exposure. However, γGT activity was markedly increased under acute exposure. Gonadal steroids' response to LH induction was inhibited by ES in vitro. ES did not prove to be estrogenic (Vtg induction in males), but the alterations observed at different points of action of the ES in the axis could become crucial during reproduction and under prolonged exposure periods in the wild [123–125].

After bioaccumulation and distribution behavior analysis of ES comparing the active ingredient to a commercial formulation in the same species, it was demonstrating a rapid metabolism of α- and β-isomers to endosulfan sulfate in tissues. Gills isomer levels were highest due to the recent uptake. Levels of endosulfan sulfate were highest in liver and testes for the active ingredient and testes and brain for the commercial formulation [126].

In this context, it is essential to focus on reducing the impact of agricultural production, establishing clear policies and action plans for the use of insecticides worldwide.

8 Alkylphenols

Long-chain alkylphenol polyethoxylates (APEs) are nonionic surfactants widely used in the manufacture of cleaning agents, household and industrial detergents, additives, plastic polymers, pulp and paper, textiles, and cosmetic

products [127]. Environmental or wastewater treatment degradation of these organic compounds results in short-chain alkylphenols, which are usually more persistent in the aquatic environment and may bioaccumulate in fish. Most alkylphenols can act as a xenoestrogen exerting feminizing effects in both mammals and fish, resulting in reproductive impairment [128].

Two of the more studied short-chain alkylphenols generated by degradation of APEs upon discharge through wastewater are 4-nonylphenol (NP) and 4-octylphenol (OP). They are both persistent in the aquatic environment being frequently found in surface waters in concentrations up to 30 mg/L [129–131]. Both compounds had been shown to act as xenoestrogens, with estrogenic potency consistent with ER agonistic behavior [132,133]. Using zebrafish as a model, OP has been described as responsible of activating mainly ERβ [134].

Due to the action of APEs as xenoestrogens, there have been a multitude of studies showing reproductive axis disruption of alkylphenols in male fish. In a study screening endocrine disruptor biomarkers in tilapia species (*Tilapia guineensis*, *Sarotherodon galileaus*, and *O. niloticus*) along the Ogun River in Nigeria, strong positive correlations were observed between increased biomarkers in male fish (hepatic zona radiata proteins and aromatase mRNA levels, plasma E2, LH, and FSH concentrations) and body burden of NP and OP, suggesting possible feminization effects of these contaminants in males [135]. When male catfish *Clarias gariepinus* were exposed to 100 μg/L NP, several hormone plasma levels were altered: E2, LH, and cortisol were increased, whereas thyroid axis hormones (TSH, triiodothyronine T3), T and FSH levels decreased [136].

At the hypothalamic level, NP showed reproductive axis disruption by reducing expression of all three GnRH genes in medaka embryos (*Oryzias latipes*); fish also exhibited retarded growth and longer time to hatch [137]. Levels of GnRH receptor (GnRHR) mRNA were likewise reduced in testes of secondary males of the hermaphroditic species *Kryptolebias marmoratus* by exposure to NP [138]. Contrastingly, GnRHR expression levels were stimulated by exposure to OP in pituitary and gonads of secondary males of this same species [138].

Pituitary effects were also observed in *K. marmoratus* following OP exposure, where FSHβ subunit mRNA expression was stimulated in hermaphrodite fish, even though no change was observed in secondary males; the inverse result was observed for the α subunit, which was stimulated by OP in secondary males but not in hermaphrodites [139]. Oral administration of OP for 28 days caused decreased plasma T and cortisol levels in the rabbitfish *Siganus oramin* males [140]. Similar decreased plasma levels of T, alongside with those of FSH, were observed in male Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) exposed to NP [141].

Regarding testicular disruption, histopathological lesions in testes, including hyperemia and degeneration of spermatogonia, were among the effects caused by exposure to 1–100 mg/L NP in male Caspian brown trout (*S. trutta caspius*) smolts [141]. In male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), exposure to NP inhibited semen production, even though sperm motility and fertilization rates were not affected [142]. Male medaka (*O. latipes*) showed abnormal spermatogenesis, testis-ova induction, and reduced gonadostomatic index following NP treatment [143]. Exposure of medaka eggs to NP also induced testis-ova in genetic males and sex reversal from genetic males to phenotypic females. Even though *gsdf* expression and growth factor related to testis differentiation and maintenance were not altered in genetic females, genetic males showed significantly lower levels than control animals [144].

Vitellogenin, a complex phosphoglycolipoprotein produced in the liver by females in response to estrogens, has been extensively used as a biomarker of estrogenic chemicals. Alkylphenols have therefore been able to induce hepatic VTG expression in males of many fish species. In medaka (*O. latipes*), males treated with NP for 21 days showed increased hepatic VTG levels [145]. Vitellogenin gene expression was likewise increased by NP and OP in the liver of the killifish *K. marmoratus* [146]. Vitellogenin was detected in plasma and mucus of male adult *C. dimerus* exposed to OP for 60 days, together with impaired testicular structure (fibrosis, lobular disorganization, and spermatogenesis disruption) [147]. These alterations were reversible and were no longer evident upon transfer to OP-free water for 28 days [148].

Estrogen receptors have also been described as a likely target of xenoestrogens. Levels of ERα mRNA increased, whereas levels of ERβ2 mRNA decreased in testes of Nile tilapia (*O. niloticus*) following a 2-week exposure to NP [149]. Similarly, in male goldfish (*C. auratus*) exposed to NP for 25 days, ERα levels increased not only in testes and liver but also in kidney and spleen; a decrease of plasma T and an increase in plasma E2 levels was also observed [150]. In *C. dimerus*, exposure to low levels of OP upregulated VTG, ERα, and ERβ2 mRNA liver expression after 3 days (Fig. 2) [151,152].

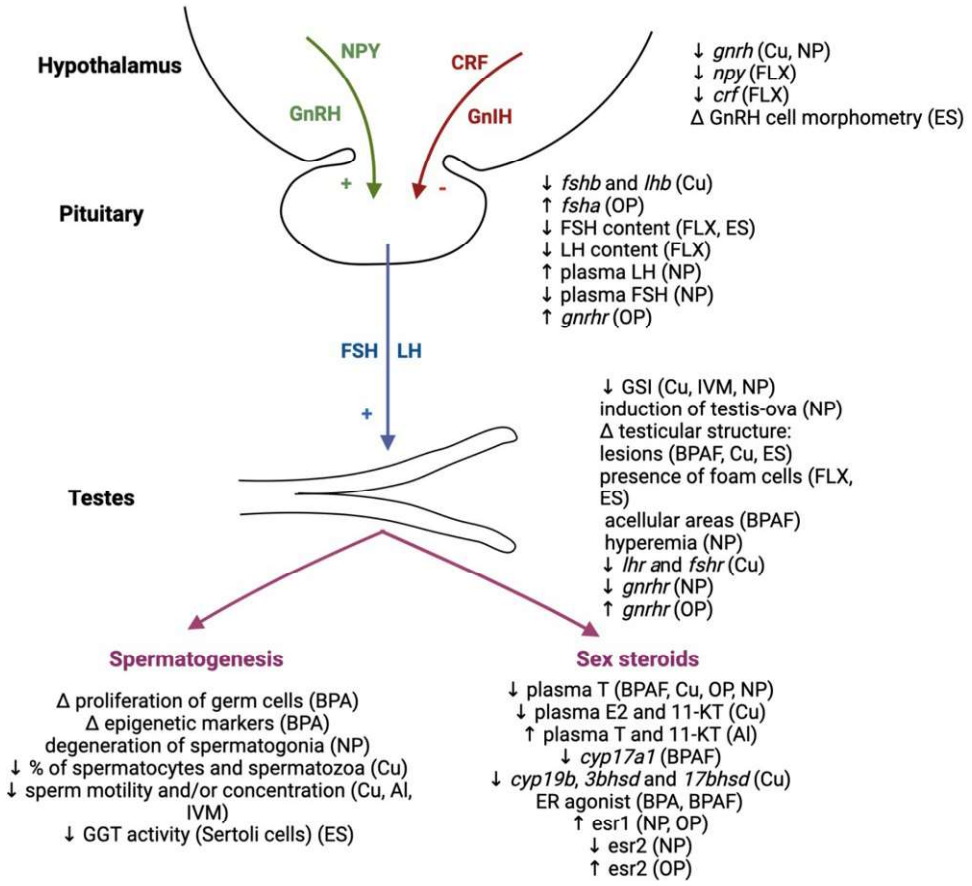


FIG. 2 Hypothalamus-pituitary-testes axis in fish showing disruption of the selected EDCs discussed in the text. Selected metals, pesticides, and pharmaceuticals show potential endocrine disruption at all levels of the axis. Bisphenols effects are predominant at the testes level, affecting both spermatogenesis and steroidogenesis. ↓, increase; ↑, decrease; △, alteration/change; *3bhsd*, 3b-hydroxysteroid dehydrogenase; 11-KT, 11 keto-testosterone; *17bhsd*, 17b-hydroxysteroid dehydrogenase; Al, aluminum; BPA, bisphenol A; BPAF, bisphenol AF; CRF, corticotropin-releasing factor; Cu, copper; *cyp17a1*, cytochrome P450 17A1; *cyp19b*, aromatase; E2, 17bestradiol; ER, estrogen receptor; ES, endosulfan; *esr1*, estrogen receptor a; *esr2*, estrogen receptor b; FLX, fluoxetine; FSH, follicle-stimulating hormone; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; GnIH, gonadotropin inhibitory hormone; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; *gnrhr*, GnRH receptor; GSI, gonadosomatic index; IVM, ivermectin; LH, luteinizing hormone; NP, nonylphenol; NPY, neuropeptide Y; OP, octylphenol; T, testosterone.

References

[1] Delbes G, Blázquez M, Fernandino JI, Grigorova P, Hales BF, Metcalfe C, et al. Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: mechanistic insights from fish and mammals. Environ Res 2022;204, 112040.
[2] La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. Nat Rev Endocrinol 2019;16(1):45–57.
[3] Birnbaum LS. State of the Science of Endocrine Disruptors. Environ Health Perspect 2013;121(4), a107.
[4] Schulz RW, Nobrega RH. Regulation of spermatogenesis. In: Farrell AP, editor. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment, 1; 2011. p. 627–34.
[5] Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. J Fish Biol 2010;76 (1):129–60.
[6] Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. Neuroendocrinology 1987;45(6):451–8.
[7] Weltzien F-A, Pasqualini C, Sébert M-E, Vidal B, Le Belle N, Kah O, et al. Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European Eel (Anguilla anguilla). Endocrinology 2006;147(6):2964–73.
[8] Trudeau VL, Somoza GM. Multimodal hypothalamo-hypophysial communication in the vertebrates. Gen Comp Endocrinol 2020;1(293), 113475.
[9] Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland M, Sbaihi M, Vernier P, et al. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. Biol Reprod 2004;71:1491–500.
[10] Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen Comp Endocrinol 2010;165(3):438–55.
[11] Peng C, Trudeau VL, Peter RE. Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: effects of sex steroids. J Neuroendocrinol 1993;5(3):273–80.

[12] Assan D, Mustapha UF, Chen H, Li Z, Peng Y, Li G. The roles of neuropeptide Y (Npy) and peptide YY (Pyy) in teleost food intake: a mini review. Life (Basel, Switzerland) 2021;11(6):547.
[13] Mañanos EL, Anglade I, Chyb J, Saligaut C, Breton B, Kah O. Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. Neuroendocrinology [Internet] 1999;69(4):269–80.
[14] Tsutsui K, Bentley GE, Ubuka T, Saigoh E, Yin H, Osugi T, et al. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). Gen Comp Endocrinol 2007;153(1–3):365–70.
[15] Muñoz-Cueto JA, Paullada-Salmerón JA, Aliaga-Guerrero M, Cowan ME, Parhar IS, Ubuka T. A Journey through the gonadotropin-inhibitory hormone system of fish. Front Endocrinol 2017;30(8):285.
[16] Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós EL, Gómez A, Lareyre JJ. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. Gen Comp Endocrinol 2010;165(3):412–37.
[17] Schulz RW, de França LR, Lareyre J-J, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, et al. Spermatogenesis in fish. Gen Comp Endocrinol 2010;165(3):390–411.
[18] Safian D, Bogerd J, Schulz RW. Regulation of spermatogonial development by Fsh: the complementary roles of locally produced Igf and Wnt signaling molecules in adult zebrafish testis. Gen Comp Endocrinol 2019;1(284), 113244.
[19] Chen SX, Bogerd J, Schoonen NE, Martijn J, de Waal PP, Schulz RW. A progestin (17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. Gen Comp Endocrinol 2013;1(185):1–9.
[20] Norris DO, Carr JA. Vetrebrate endocrinology. 5th ed. Elsevier; 2013.
[21] Young G, Kusakabe M, Nakamura I, Lokman PM, Goetz FW. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. In: Melamed P, Sherwood N, editors. Hormones and their receptors in fish reproduction; 2005. p. 155–223.
[22] Candelone J-P, Hong S, Pellone C, Boutron C. Post industrial revolution changes in large scale atmospheric pollution of the northern hemisphere for heavy metals as documented in central Greenland snow and ice. J Geophys Res 1995;100(D8):16,605–6,616.
[23] Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ Health Perspect 1993;101(5):378–84.
[24] Ma Y, He X, Qi K, Wang T, Qi Y, Cui L, Wang F, Song M. Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. J Environ Sci 2019;77:210–7.
[25] Selvaraju V, Baskaran S, Agarwal A, Henkel R. Environmental contaminants and male infertility: effects and mechanisms. Andrologia 2020;24:13646.
[26] González-Rubio S, Ballesteros-Gómez A, Asimakopoulos AG, Jaspers VLB. A review on contaminants of emerging concern in European raptors (2002−2020). Sci Total Environ 2021;760, 143337.
[27] Menezo Y, Dale B, Elder K. The negative impact of the environment on methylation/epigenetic marking in gametes and embryos: a plea for action to protect the fertility of future generations. Mol Reprod Dev 2019;86(10):1273–82.
[28] Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H, Abdollahi M. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. Life Sci 2016;145:265–73.
[29] Calamandrei G, Ricceri L. In: Aschner M, Costa LG, editors. Chapter Seven—developmental neurotoxicity of endocrine disruptor chemicals: a challenge for behavioral toxicology, 2. ScienceDirect. Academic Press; 2018. p. 197–225.
[30] Al-Hiyasat AS, Darmani H, Elbetieha AM. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. Eur J Oral Sci 2002;110(2):163–7.
[31] Zhang C, Li YH, Mo LY, Qin LT. Genotoxicity of environmental hormones: a review. Adv Mat Res 2014;864–867:172–8.
[32] Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, et al. An ecological assessment of bisphenol A: evidence from comparative biology. Reprod Toxicol 2007;24(2):225–39.
[33] Forner-Piquer I, Fakriadis I, Mylonas CC, Piscitelli F, Di Marzo V, Maradonna F, et al. Effects of dietary bisphenol A on the reproductive function of gilthead sea bream (Sparus aurata) testes. Int J Mol Sci 2019;20(20):E5003.
[34] Sodré FF, Locatelli MAF, Jardim WF. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. Water Air Soil Pollut 2009;206(1–4):57–67.
[35] Gani KM, Kazmi AA. Contamination of emerging contaminants in Indian aquatic sources: first overview of the situation. J Hazard Toxic Radioact Waste 2017;21(3):04016026.
[36] Sauvé S, Desrosiers M. A review of what is an emerging contaminant. Chem Cent J 2014;8(1).
[37] Nelson AM, Long TE. A perspective on emerging polymer technologies for bisphenol-A replacement. Polym Int 2012;61(10):1485–91.
[38] Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP Cerhr Mon 2008;1–64. 1;(22):v, vii–ix.
[39] Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. J Steroid Biochem Mol Biol 2011;127(1–2):27–34.
[40] Shi M, Sekulovski N, MacLean JA, Hayashi K. Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. Reprod Toxicol 2017;73:280–91.
[41] Nicholson TM, Nguyen JL, Leverson GE, Taylor JA, Vom Saal FS, Wood RW, et al. Endocrine disruptor bisphenol A is implicated in urinary voiding dysfunction in male mice. Am J Physiol Renal Physiol 2018;315(5):F1208–16.
[42] Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. Reprod Toxicol 2007;24(2):178–98.
[43] Delfosse V, Grimaldi M, Pons J-L, Boulahtouf A, le Maire A, Cavailles V, et al. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109(37):14930–5.
[44] Moon MK. Concern about the safety of bisphenol A substitutes. Diabetes Metab J 2019;43(1):46–8.
[45] Ullah A, Pirzada M, Jahan S, Ullah H, Turi N, Ullah W, et al. Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamus-pituitary-testicular activities in adult rats: a focus on the possible hormonal mode of action. Food Chem Toxicol 2018;121:24–36.
[46] Li C, Zhang L, Ma T, Gao L, Yang L, Wu M, et al. Bisphenol A attenuates testosterone production in Leydig cells via the inhibition of NR1D1 signaling. Chemosphere 2021;263, 128020.

[47] Xie M, Bu P, Li F, Lan S, Wu H, Yuan L, et al. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. Oncotarget 2016;7(9).
[48] Santangeli S, Consales C, Pacchierotti F, Habibi HR, Carnevali O. Transgenerational effects of BPA on female reproduction. Sci Total Environ 2019;685:1294–305.
[49] González-Rojo S, Lombó M, Fernández-Díez C, Herráez MP. Male exposure to bisphenol A impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. Environ Pollut 2019;248:368–79.
[50] Kinch CD, Ibhazehiebo K, Jeong J-H, Habibi HR, Kurrasch DM. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. Proc Natl Acad Sci USA 2015;112(5):1475–80.
[51] Gyimah E, Xu H, Dong X, Qiu X, Zhang Z, Bu Y, et al. Developmental neurotoxicity of low concentrations of bisphenol A and S exposure in zebrafish. Chemosphere 2021;1(262), 128045.
[52] Calafat AM, Xiaoyun Y, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. Population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003:2004. Environ Health Perspect 2008;116(1):39–44.
[53] Supornsilchai V, Jantarat C, Nosoognoen W, Pornkunwilai S, Wacharasindhu S, Soder O. Increased levels of bisphenol A (BPA) in Thai girls with precocious puberty. J Pediatr Endocrinol Metab 2016.
[54] Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Ye X, Calafat AM, et al. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. Hum Reprod 2012;27(12):3583–92.
[55] Li D-K, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, et al. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. Fertil Steril 2011;95(2). 625-630.e4.
[56] Choi YJ, Lee LS. Aerobic soil biodegradation of bisphenol (BPA) alternatives bisphenol S and bisphenol AF compared to BPA. Environ Sci Technol 2017;51(23):13698–704.
[57] Wang Q, Chen M, Shan G, Chen P, Cui S, Yi S, et al. Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake. China Sci Total Environ 2017;598:814–20.
[58] Gupta MC, Viswanath SG. Role of metal oxides in the thermal degradation of bisphenol a polycarbonate. J Thermal Anal 1996;46(6):1671–9.
[59] Cao G, He R, Cai Z, Liu J. Photolysis of bisphenol S in aqueous solutions and the effects of different surfactants. React Kinetics Mech Catal 2013;1(109):259–71.
[60] Fang Z, Gao Y, Wu X, Xu X, Sarmah AK, Bolan N, et al. A critical review on remediation of bisphenol S (BPS) contaminated water: efficacy and mechanisms. Crit Rev Environ Sci Technol 2019;50(5):476–522.
[61] Wei X, Huang Y, Wong MH, Giesy JP, Wong CKC. Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta. China Chemosph 2011;85(1):122–8.
[62] Barboza LGA, Cunha SC, Monteiro C, Fernandes JO, Guilhermino L. Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers. J Hazard Mater 2020;393, 122419.
[63] Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, et al. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. Environ Health Perspect 1998;106(3):167–74.
[64] Li R, Liu S, Qiu W, Yang F, Zheng Y, Xiong Y, et al. Transcriptomic analysis of bisphenol AF on early growth and development of zebrafish (Danio rerio) larvae. Environ Sci Ecotechnol 2020;1(4), 100054.
[65] Améduri B, Boutevin B, Kostov G. Fluoroelastomers: synthesis, properties and applications. Prog Polym Sci 2001;26(1):105–87.
[66] Frankowski R, Zgoła-Grześkowiak A, Smułek W, Grześkowiak T. Removal of bisphenol A and its potential substitutes by biodegradation. Appl Biochem Biotechnol 2020;191(3):1100–10.
[67] Pinto C, Hao R, Grimaldi M, Thrikawala S, Boulahtouf A, Aït-Aïssa S, et al. Differential activity of BPA, BPAF and BPC on zebrafish estrogen receptors in vitro and in vivo. Toxicol Appl Pharmacol 2019;1(380), 114709.
[68] Sun Q, Wang Y, Li Y, Ashfaq M, Dai L, Xie X, et al. Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City. China Environ Pollut 2017;1(225):542–9.
[69] Le Fol V, Aït-Aïssa S, Sonavane M, Porcher J-M, Balaguer P, Cravedi J-P, et al. In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. Ecotoxicol Environ Saf 2017;142:150–6.
[70] Matsushima A, Liu X, Okada H, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ERα but a highly specific antagonist for ERβ. Environ Health Perspect 2010;118(9):1267–72.
[71] Mu X, Huang Y, Li X, Lei Y, Teng M, Li X, et al. Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. Environ Sci Technol 2018;52(5):3222–31.
[72] Kojima H, Takeuchi S, Sanoh S, Okuda K, Kitamura S, Uramaru N, et al. Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. Toxicology 2019;1(413):48–55.
[73] Cai M, Li Y-Y, Zhu M, Li J-B, Qin Z-F. Evaluation of the effects of low concentrations of bisphenol AF on gonadal development using the Xenopus laevis model: a finding of testicular differentiation inhibition coupled with feminization. Environ Pollut (Barking, Essex: 1987) 2020;260:113980.
[74] Tang T, Yang Y, Chen Y, Tang W, Wang F, Diao X. Thyroid disruption in zebrafish larvae by short-term exposure to bisphenol AF. Int J Environ Res Public Health 2015;12(10):13069–84.
[75] Moreman J, Lee O, Trznadel M, David A, Kudoh T, Tyler CR. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. Environ Sci Technol 2017;51(21):12796–805.
[76] Shi J, Jiao Z, Zheng S, Li M, Zhang J, Feng Y, et al. Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (Danio rerio), and the impact on offspring. Chemosphere 2015;(128):252–7.
[77] Yang X, Liu Y, Li J, Chen M, Peng D, Liang Y, et al. Exposure to bisphenol AF disrupts sex hormone levels and vitellogenin expression in zebrafish. Environ Toxicol 2016;31(3):285–94.
[78] Wu D, Huang C-J, Jiao X-F, Ding Z-M, Zhang S-X, Miao Y-L, et al. Bisphenol AF compromises blood-testis barrier integrity and sperm quality in mice. Chemosphere 2019;237, 124410.
[79] Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Li M, Shao B. Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. Toxicol Lett 2012;211(2):201–9.

[80] Evans TJ. Chapter 58: Endocrine disruption. In: Gupta, editor. Reproductive and developmental toxicology; 2017. p. 1091–110.
[81] Lee TW, Kim DH, Ryu JY. The effects of exposure to lead, cadmium and mercury on follicle-stimulating hormone levels in men and postmenopausal women: data from the Second Korean National Environmental Health Survey (2012–2014). Ann Occup Environ Med 2019;31, e21. https://doi.org/10.35371/aoem.2019.31.e21.
[82] Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. Curr Opin Chem Biol 2002;6(2):171–80.
[83] Lin Y-H, Shie Y-Y, Shiau S-Y. Dietary copper requirements of juvenile grouper. Epinephelus malabaricus Aquac 2008;274(1):161–5.
[84] Cao J, Wang G, Wang T, Chen J, Wenjing G, Wu P, et al. Copper caused reproductive endocrine disruption in zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicol (Amsterdam, Netherlands) 2019;1(211):124–36.
[85] Zhang L-H, Luo Z, Song Y-F, Shi X, Pan Y-X, Fan Y-F, et al. Effects and mechanisms of waterborne copper exposure influencing ovary development and related hormones secretion in yellow catfish Pelteobagrus fulvidraco. Aquatic Toxicol (Amsterdam, Netherlands) 2016;1(178):88–98.
[86] Oda SS, El-Manakhly E-SM, Abou-Srag MA, Tohamy HG. Assessment of reproductive toxicity of carbofuran and copper sulfate in male Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Environ Sci Pollut Res Int 2022;29(11):15896–904.
[87] Fernández-Dávila ML, Razo-Estrada AC, García-Medina S, Gómez-Oliván LM, Piñón-López MJ, Ibarra RG, et al. Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae—Ctenopharingodon idella). Ecotoxicol Environ Saf 2012;1(76):87–92.
[88] McCormick SD, Lerner DT, Regish AM, O'Dea MF, Monette MY. Thresholds for short-term acid and aluminum impacts on Atlantic salmon smolts. Aquaculture 2012;362–363:224–31.
[89] Kida BMS, Abdalla RP, Moreira RG. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in Astyanax altiparanae. Fish Physiol Biochem 2016;42(5):1347–56.
[90] Silva Pinheiro JP, Bertacini de Assis C, Sanches EA, Moreira RG. Aluminum, at an environmental concentration, associated with acidic pH and high water temperature, causes impairment of sperm quality in the freshwater teleost Astyanax altiparanae (Teleostei: Characidae). Environ Pollut 2020;1(262), 114252.
[91] Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW, Leung KMY, Lai RWS, Galbán-Malagón C, et al. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. Proc Natl Acad Sci USA 2022;119(8), e2113947119.
[92] Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicol Lett 2003;142(3):185–94.
[93] de Aquino S.F., Brandt E.M.F., Bottrel S.E.C., Gomes F.B.R., Silva S de Q. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian water and the risks they may represent to human health. Int J Environ Res Public Health 2021 18(22):11765.
[94] Metcalfe CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, et al. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. Environ Toxicol Chem 2010;29(1):79–89.
[95] Brooks BW, Huggett DB, Boxall ABA. Pharmaceuticals and personal care products: research needs for the next decade. Environ Toxicol Chem 2009;28(12):2469.
[96] Padhye LP, Yao H, Kung'u FT, Huang C-H. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. Water Res 2014;51:266–76.
[97] Wen Z-H, Chen L, Meng X-Z, Duan Y-P, Zhang Z-S, Zeng EY. Occurrence and human health risk of wastewater-derived pharmaceuticals in a drinking water source for Shanghai, East China. Sci Total Environ 2014;15(490):987–93.
[98] Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel Mytilus galloprovincialis? Environ Pollut 2013;173:200–9.
[99] Mennigen JA, Lado WE, Zamora JM, Duarte-Guterman P, Langlois VS, Metcalfe CD, et al. Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish. Carassius auratus Aquatic Toxicol 2010;100(4):354–64.
[100] Dorelle LS, Da Cuña RH, Rey Vázquez G, Höcht C, Shimizu A, Genovese G, et al. The SSRI fluoxetine exhibits mild effects on the reproductive axis in the cichlid fish Cichlasoma dimerus (Teleostei, Cichliformes). Chemosphere 2017;171:370–8.
[101] Dorelle LS, Da Cuña RH, Sganga DE, Rey Vázquez G, López Greco L, Lo Nostro FL. Fluoxetine exposure disrupts food intake and energy storage in the cichlid fish Cichlasoma dimerus (Teleostei, Cichliformes). Chemosphere 2020;238, 124609.
[102] Gaworecki KM, Klaine SJ. Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. Aquat Toxicol 2008;88(4):207–13.
[103] Meijide FJ, Da Cuña RH, Prieto JP, Dorelle LS, Babay PA, Lo Nostro FL. Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming, shoaling and anxiety behaviours of the mosquitofish Gambusia holbrooki. Ecotoxicol Environ Saf 2018;15(163):646–55.
[104] Benz GW, Roncalli RA, Gross SJ. Use of ivermectin in cattle, sheep, goats, and swine. Ivermectin and Abamectin 1989;215–29.
[105] Kövecses J, Marcogliese D. Avermectins, potential environmental risks and impacts on freshwater ecosystems in Québec: [Montréal]: Environment Canada. St. Lawrence Centre; 2005.
[106] Ōmura S. Ivermectin: 25 years and still going strong. Int J Antimicrob Agents 2008;31(2):91–8.
[107] Kennedy CJ, Tierney KB, Mittelstadt M. Inhibition of P-glycoprotein in the blood–brain barrier alters avermectin neurotoxicity and swimming performance in rainbow trout. Aquat Toxicol 2014;146:176–85.
[108] Thiripurasundari M, Sathya K, Uma A, Srinivasan RM, Rajasekar P. A comparative study on the toxicity of ivermectin in zebrafish and catla fish models. Indo Am J Pharm Res 2014;2231–6876.
[109] Oliveira R, Grisolia CK, Monteiro MS, Soares AMVM, Domingues I. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebrafish life stages. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol 2016;1(187):50–61.
[110] Domingues I, Oliveira R, Soares AMVM, Amorim MJB. Effects of ivermectin on Danio rerio: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. Ecotoxicology (London, England) 2016;25(3):491–9.
[111] Varó I, Rigos G, Navarro JC, del Ramo J, Calduch-Giner J, Hernández A, et al. Effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream Sparus aurata: a proteomic approach. Chemosphere 2010;80(5):570–7.
[112] Davies IM, McHenery JG, Rae GH. Environmental risk from dissolved ivermectin to marine organisms. Aquaculture 1997;158(3–4):263–75.
[113] Davies IM, Gillibrand PA, McHenery JG, Rae GH. Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. Aquaculture 1998;163(1–2):29–46.

[114] Lozano IE, Piazza YG, Babay P, Sager E, de la Torre FR, Lo Nostro FL. Ivermectin: a multilevel approach to evaluate effects in Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae), an inland fishery species. Sci Total Environ 2021;800:149515.
[115] Hassan HF, Meligi NM. Effects of sublethal abamectin exposure on some hormonal profiles and testicular histopathology in male albino rats and the possible ameliorative role of Eruca sativa. Environ Sci Pollut Res 2017;24(31):24690–7.
[116] Ucan-Marin F, Ernst W, O'Dor RK, Sherry J. Effects of food borne ivermectin on juvenile Atlantic salmon (Salmo salar L.): survival, growth, behavior, and physiology. Aquaculture 2012;334–337:169–75.
[117] Wang D, Li SW, Geng LW, Liu TY. Evaluation of ivermectin's reproductive toxicity to male Carassius auratus. J Appl Ecol 2015;26(10):3174–80.
[118] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 2003;13(2):57–149.
[119] Singh PB, Singh V. Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. Environ Toxicol Pharmacol 2008;25(3):342–50.
[120] Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (Mugil cephalus) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary. Portugal Mar Environ Res 2006;61(3):326–38.
[121] Piazza YG, Pandolfi M, Lo Nostro FL. Effect of the organochlorine pesticide endosulfan on GnRH and gonadotrope cell populations in fish larvae. Arch Environ Contam Toxicol 2010;61(2):300–10.
[122] Piazza Y, Pandolfi M, Da Cuña R, Genovese G, Lo NF. Endosulfan affects GnRH cells in sexually differentiated juveniles of the perciform Cichlasoma dimerus. Ecotoxicol Environ Saf 2015;1(116):150–9.
[123] Da Cuña RH, Rey Vázquez G, Piol MN, Guerrero NV, Maggese MC, Lo Nostro FL. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in Cichlasoma dimerus (Teleostei, Perciformes). Ecotoxicol Environ Saf 2011;74(4):1065–73.
[124] Da Cuña RH, Pandolfi M, Genovese G, Piazza Y, Ansaldo M, Lo Nostro FL. Endocrine disruptive potential of endosulfan on the reproductive axis of Cichlasoma dimerus (Perciformes, Cichlidae). Aquat Toxicol 2013;15(126):299–305.
[125] Da Cuña RH, Rey Vázquez G, Dorelle L, Rodríguez EM, Guimarães Moreira R, Lo Nostro FL. Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish Cichlasoma dimerus. Comp Biochem Physiol C 2016;187:74–80.
[126] Da Cuña RH, Lo Nostro FL, Shimabukuro V, Ondarza PM, Miglioranza KSB. Bioaccumulation and distribution behavior of endosulfan on a cichlid fish: differences between exposure to the active ingredient and a commercial formulation. Environ Toxicol Chem 2020;39(3):604–11.
[127] Ying GG, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. Environ Int 2002;28:215–26.
[128] Kochukov MY, Jeng YJ, Watson CS. Alkylphenol xenoestrogens with varying carbon chain lengths differentially and potently activate signaling and functional responses in gh3/b6/f10 somatomammotropes. Environ Health Perspect 2009;117(5):723–30. https://doi.org/10.1289/ehp.0800182.
[129] Ahel M, Giger W. Partitioning of alkylphenols and polyethoxylates between water and organic solvents. Chemosphere 1993;26:1471–8.
[130] Brix R, Postigo C, Gonzalez S, Villagrasa M, Navarro A, Kuster M, de Alda MJ, Barcelo D. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. Anal Bioanal Chem 2010;396:1301–9.
[131] Mao Z, Zheng XF, Zhang YQ, Tao XX, Li Y, Wang W. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. Int J Mol Sci 2012;13:491–505.
[132] Kawashima Y, Onishi Y, Tatarazako N, Yamamoto H, Koshio M, Oka T, Horie Y, Watanabe H, Nakamoto T, Yamamoto J, Ishikawa H, Sato T, Yamazaki K, Iguchi T. Summary of 17 chemicals evaluated by OECD TG229 using Japanese Medaka, Oryzias latipes in EXTEND 2016. J Appl Toxicol 2022;42(5):750–77. https://doi.org/10.1002/jat.4255.
[133] Stoykova P, Ohkawa H, Inui H. Simple monitoring of endocrine-disrupting chemicals using transgenic Arabidopsis plants expressing medaka estrogen receptor. Chemosphere 2022;286, 131633. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131633.
[134] Huang W, Ai W, Lin W, Fang F, Wang X, Huang H, Dahlgren RA, Wang H. Identification of receptors for eight endocrine disrupting chemicals and their underlying mechanisms using zebrafish as a model organism. Ecotoxicol Environ Saf 2020;204, 111068. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111068.
[135] Ibor OR, Adeogun AO, Fagbohun OA, Arukwe A. Gonado-histopathological changes, intersex and endocrine disruptor responses in relation to contaminant burden in Tilapia species from Ogun River. Nigeria Chemosphere 2016;164:248–62. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.087.
[136] Sayed AEH, Ismail RFK. Endocrine disruption, oxidative stress, and testicular damage induced by 4-nonylphenol in Clarias gariepinus: the protective role of Cydonia oblonga. Fish Physiol Biochem 2017;643(4):1095–104. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0355-2.
[137] Lee W, Kang CW, Su CK, Okubo K, Nagahama Y. Screening estrogenic activity of environmental contaminants and water samples using a transgenic medaka embryo bioassay. Chemosphere 2012;88(8):945–52. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.024.
[138] Rhee JS, Seo JS, Raisuddin S, Ki JS, Lee KW, Kim IC, Yoon YD, Lee JS. Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) gene expression is differently modulated in gender types of the hermaphroditic fish Kryptolebias marmoratus by endocrine disrupting chemicals. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2008;147(3):357–65.
[139] Rhee JS, Lee YM, Seo JS, Han J, Lee JS. Expression of gonadotropin alpha, follicle-stimulating hormone beta, and luteinizing hormone beta genes of the hermaphroditic fish Kryptolebias marmoratus exposed to octylphenol, 17beta estradiol, and tamoxifen. Ann N Y Acad Sci 2009;1163:508–11. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04450.x.
[140] Du YB, Li YY, Zhen YJ, Hu CB, Liu WH, Chen WZ, Sun ZW. Toxic Effects in Siganus oramin by dietary exposure to 4-tert-octylphenol. Bull Environ Contam Toxicol 2008;80(6):534–8. https://doi.org/10.1007/s00128-008-9388-7.
[141] Shirdel I, Kalbassi MR, Esmaeilbeigi M, Tinoush B. Disruptive effects of nonylphenol on reproductive hormones, antioxidant enzymes, and histology of liver, kidney and gonads in Caspian trout smolts. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2020;232, 108756. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108756.
[142] Lahnsteiner F, Berger B, Grubinger F, Weismann T. The effect of 4-nonylphenol on semen quality, viability of gametes, fertilization success, and embryo and larvae survival in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquat Toxicol 2005;71(4):297–306. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.007.
[143] Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Hano T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. Effects of 4-nonylphenol on reproduction of Japanese medaka. Oryzias latipes Environ Toxicol Chem 2003;22(10):2438–45. https://doi.org/10.1897/02-225.

[144] Horie Y, Kanazawa N, Takahashi C, Tatarazako N, Iguchi T. Exposure to 4-nonylphenol induces a shift in the gene expression of gsdf and testis-ova formation and sex reversal in Japanese medaka (Oryzias latipes). J Appl Toxicol 2021;41(3):399–409. https://doi.org/10.1002/jat.4051.
[145] Ishibashi H, Hirano M, Matsumura N, Watanabe N, Takao Y, Arizono K. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (Oryzias latipes). Chemosphere 2006;65(6):1019–26. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.034.
[146] Kim BM, Lee MC, Kang HM, Rhee JS, Lee JS. Genomic organization and transcriptional modulation in response to endocrine disrupting chemicals of three vitellogenin genes in the self-fertilizing fish Kryptolebias marmoratus. J Environ Sci (China) 2016;42:187–95. https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.08.006.
[147] Rey Vázquez G, Meijide FJ, Da Cuña RH, Lo Nostro FL, Piazza YG, Babay PA, Trudeau VL, Maggese MC, Guerrero GA. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish Cichlasoma dimerus (Teleostei, Perciformes). Comp Biochem Physiol C 2009;150:298–306.
[148] Rey Vázquez G, Meijide FJ, Lo Nostro FL. Recovery of the reproductive capability following exposure to 4-tert-octylphenol in the neotropical cichlid fish Cichlasoma dimerus. Bull Environ Contam Toxicol 2016;96(5):585–90. https://doi.org/10.1007/s00128-016-1766-y.
[149] Huang W, Zhang Y, Jia X, Ma X, Li S, Liu Y, Zhu P, Lu D, Zhao H, Luo W, Yi S, Liu X, Lin H. Distinct expression of three estrogen receptors in response to bisphenol A and nonylphenol in male Nile tilapias (Oreochromis niloticus). Fish Physiol Biochem 2010;36(2):237–49. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9280-8.
[150] Ardeshir RA, Rastgar S, Salati AP, Zabihi E, Movahedinia A, Feizi F. The effect of nonylphenol exposure on the stimulation of melanomacrophage centers, estrogen, and testosterone level, and ERα gene expression in goldfish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2022;254, 109270. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109270.
[151] Genovese G, Regueira M, Piazza Y, Towle DW, Maggese MC, Lo NF. Time-course recovery of estrogen-responsive genes of a cichlid fish exposed to waterborne octylphenol. Aquat Toxicol 2012;15(114–115):1–13. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.005.
[152] Genovese G, Regueira M, Da Cuña RH, Ferreira MF, Varela ML, Lo Nostro FL. Nonmonotonic response of vitellogenin and estrogen receptor gene expression after octylphenol exposure of Cichlasoma dimerus (Perciformes, Cichlidae). Aquat Toxicol 2014;156:30–40.