

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 28/08/2026.

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 BIOCÊNCIAS 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 constituída 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

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 caminhada: 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 estrangeiras, 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 Boralí 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 Boralí, 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 (<i>D. rerio</i>) 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 (<i>Danio rerio</i>) 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 (<i>Danio rerio</i>).....	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 (<i>Danio rerio</i>).....	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 endócrino varia 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).

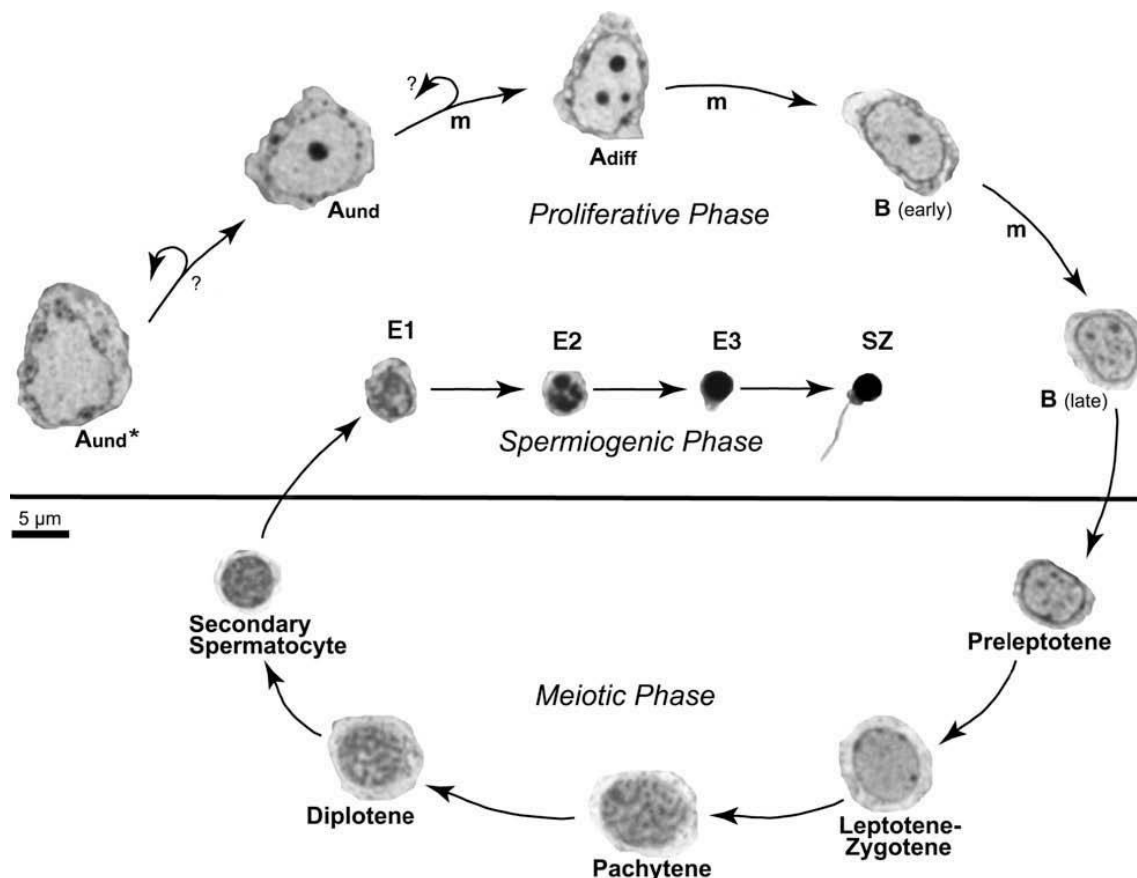


Figura 1. Representação da espermatogênese do zebrafish, partindo das espermatogônias indiferenciadas do tipo A até espermatozóides, ao longo das três fases do processo espermatogênico: espermatogonial, proliferativa ou mitótica; meiótico ou espermiogênica e espermiogênica. As micrografias mostram as 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 adjacientemente 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).

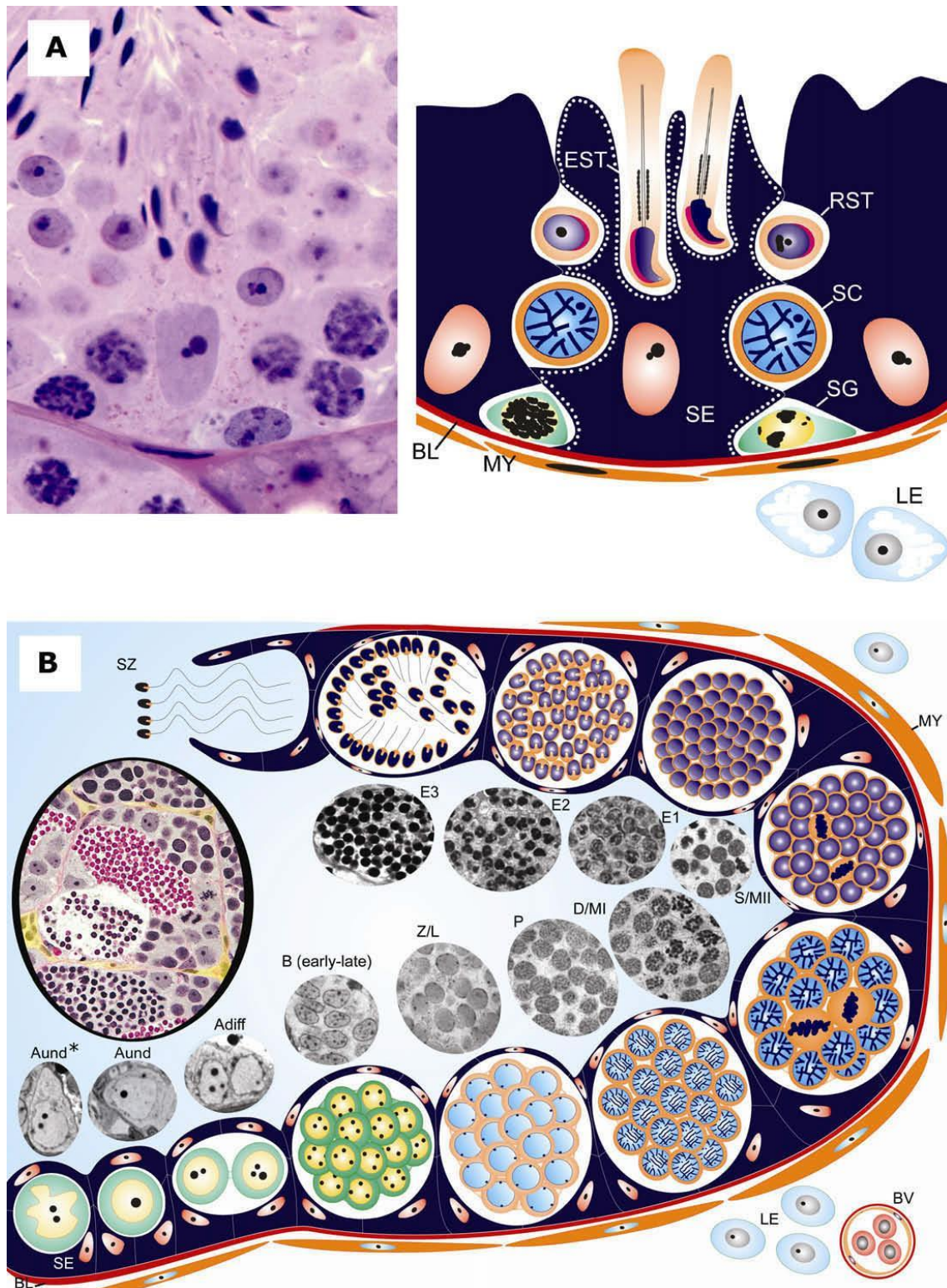


Figura 2. Comparação entre a espermatogênese em estádios de amniotas (répteis, aves, mamíferos) (A) e espermatogênese cística dos anamniotas (peixes, anfíbios) (B). A Figura ilustra as diferenças entre a relação célula de Sertoli/célula germinativa na espermatogênese em estádios e cística. Em A, uma 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), espermatogônia (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); espermátocitos primários em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno/metáfase I (D/MI); espermátocitos secundários/metáfase II (S/MII); espermátides iniciais (E1); intermediárias (E2); finais (E3); espermatozóides (SZ); e vasos sanguíneo (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).

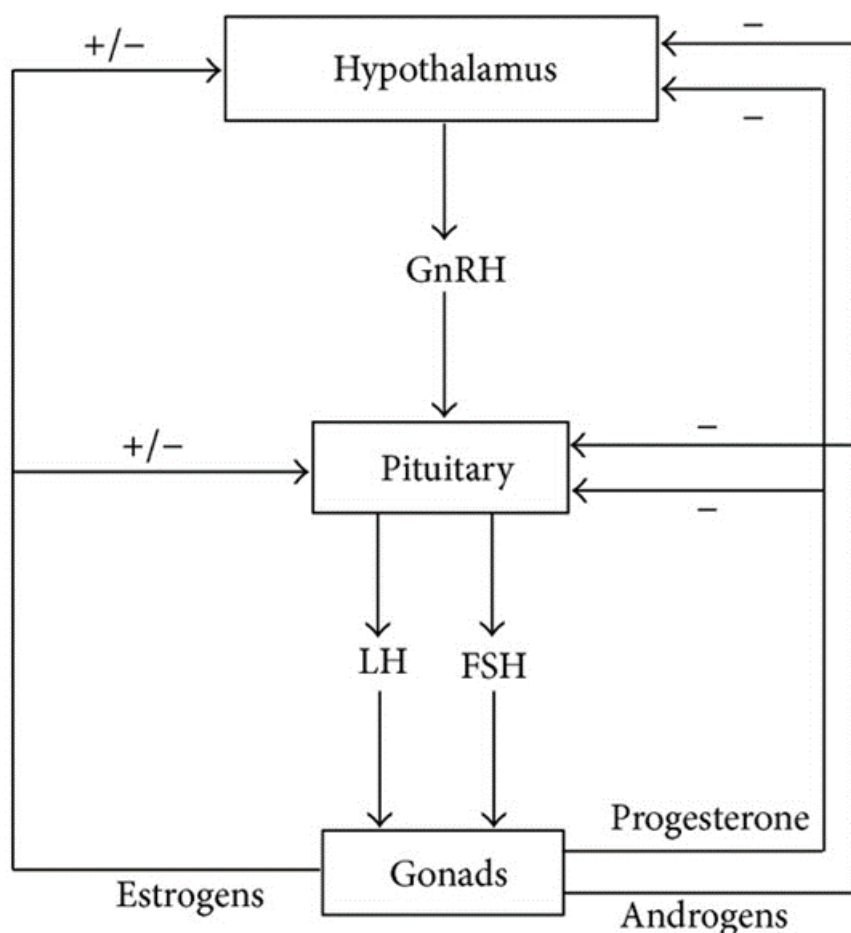


Figura 3. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HPG) mostrando seus principais elementos, assim como sua regulação (Retirado de Cottone *et al.*, 2013).

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).

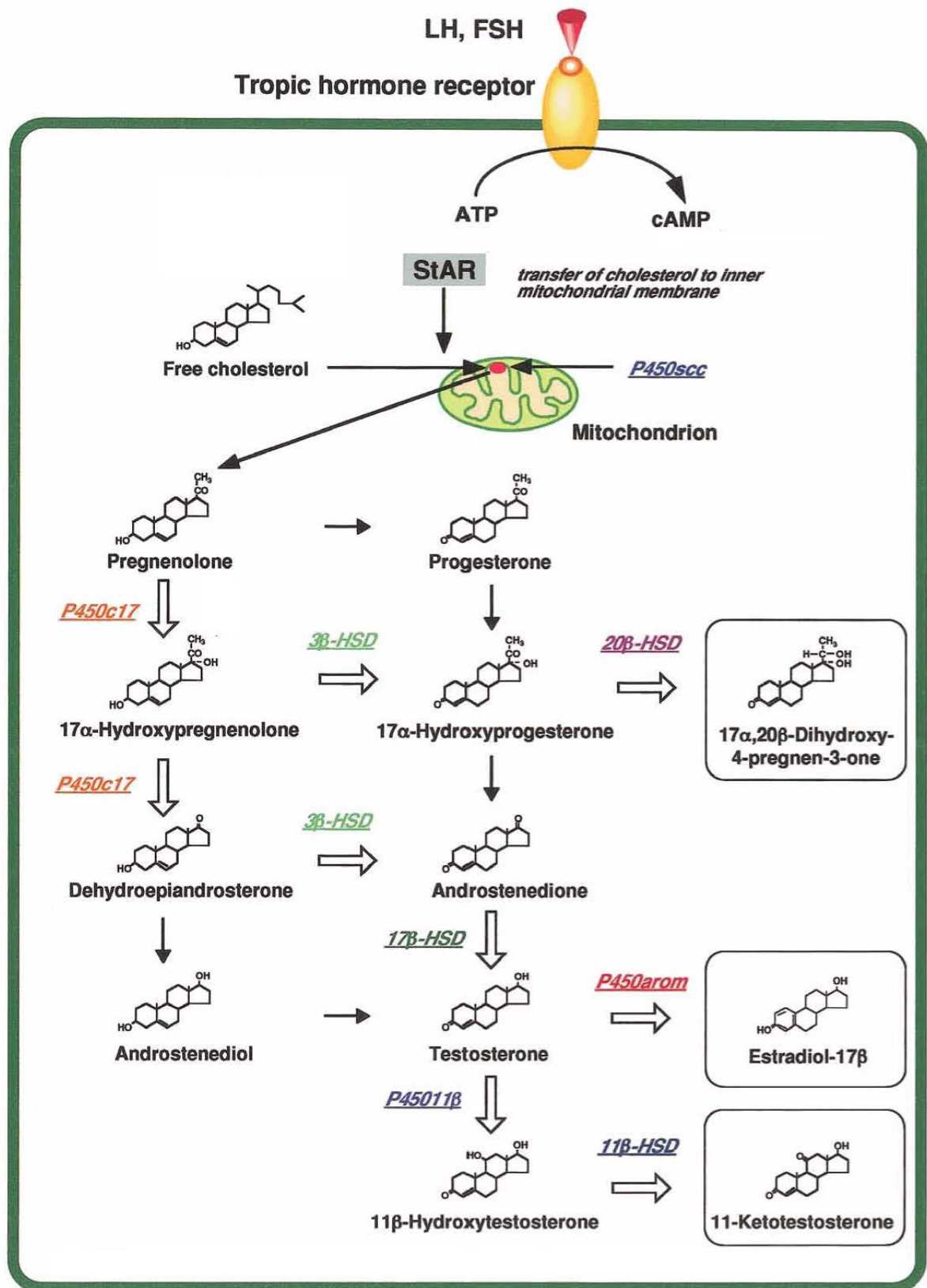


Figura 4. Biossíntese dos hormônios esteroides nas gônadas de peixes teleósteos (Adaptado de Young *et al.*, 2005).

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 11 β -HSD (11 β -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.

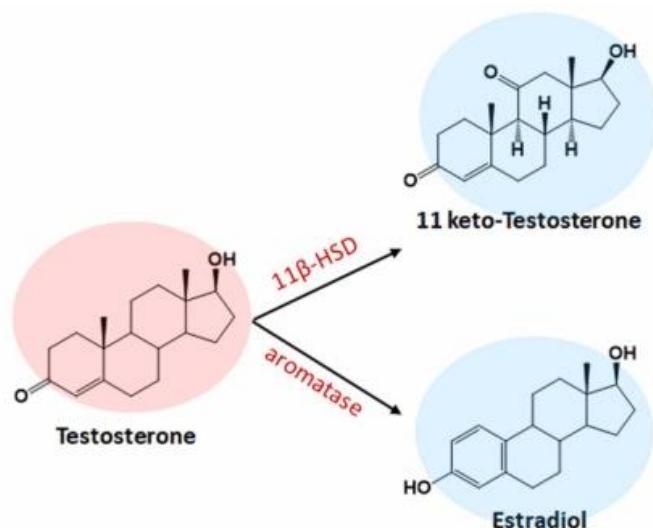


Figura 5. Conversão da testosterona em 11-Ketotestosterona (11-KT) pela enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11 β -HSD) ou estradiol via enzima Cyp19a1 (Aromatase) (Adaptado de Park *et al.*, 2022).

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 indústria 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 Nº 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 (ER α e ER β) (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 demonstrado que a exposição a 50 μ g/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, répteis 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 espermatogênicos, 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 espermatídes 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-Krzyszewska *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, conseqüentemente, 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.

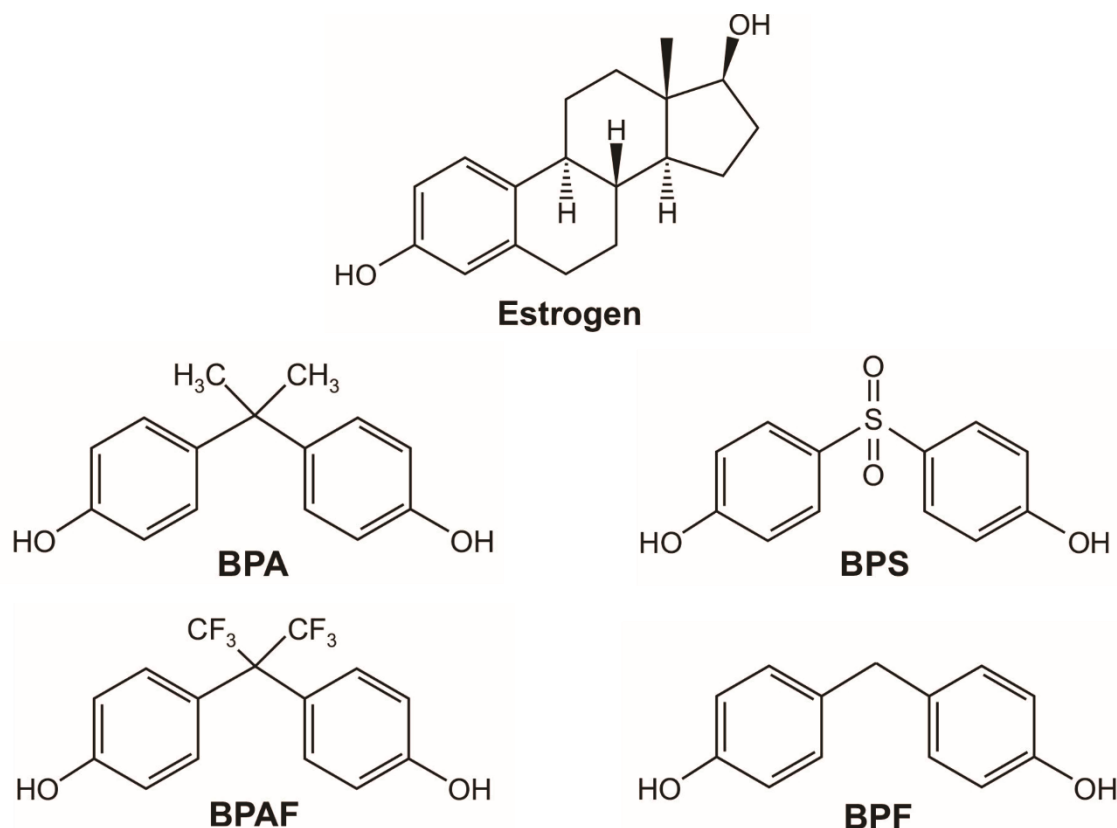


Figura 6. Estruturas químicas do estrogênio, bisfenol A (BPA) e os principais bisfenóis alternativos ao BPA: bisfenol S (BPS), bisfenol AF (BPAF) e bisfenol F (BPF) (Modificado de Winz & Suh, 2021).

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 (Nejuma *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 Vietnã, 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 a 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 Coreia 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 ER α e ER β , respectivamente (Matsushima *et al.*, 2010). Além disso, Mu e colaboradores (2018), demonstraram em um estudo *in silico* 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 (ER α e ER β) 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 (*Xenopus 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 *dmrtl*, *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). Convergingo 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

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 17 β -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 Atlantic cod (*Gadus 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., Vilroix, 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 curvnotus*. *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. *Development*, 146(21), dev178665.
- Czarny-Krzyńska, 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 5 α -dihydrotestosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 203, 106-119.
- Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Smulek, 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 Cunha, 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-Diez, 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-Diez, 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 $\beta 1$ (ER $\beta 1$) 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., Ancuti, A. N., Kütter, M. T., & Martínez, P. E. (2019). Effects of Bisphenol A on redox balance in red blood and sperm cells and spermatogenic 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- α -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 boudierus*. *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.