

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Davidson Peruci Moreira

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ACETAMINOFENO NA REPRODUÇÃO
DO *Danio rerio* EM UMA GERAÇÃO PARENTAL E SUA PROLE**

Belo Horizonte

2023

Davidson Peruci Moreira

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ACETAMINOFENO NA REPRODUÇÃO
DO *Danio rerio* EM UMA GERAÇÃO PARENTAL E SUA PROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Rizzo

Belo Horizonte

2023

043

Moreira, Davidson Peruci.

Efeito da exposição crônica ao acetaminofeno na reprodução do *Danio rerio* em uma geração parental e sua prole [manuscrito] / Davidson Peruci Moreira. – 2023.

82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Elizete Rizzo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Peixe-Zebra. 3. Disruptores Endócrinos. 4. Gônadas. 5. Moduladores de Receptor Estrogênico. 6. Metilação de DNA. I. Rizzo, Elizete. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE DAVIDSON PERUCI MOREIRA

Às **quatorze horas** do dia **27 de fevereiro de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ACETAMINOFENO NA REPRODUÇÃO DO ZEBRAFISH DANIO RERIO NA GERAÇÃO PARENTAL E EM SUA PROLE**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Elizete Rizzo Bazzoli**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli	UFMG	Aprovado
Dr. Enrrico Bloise	UFMG	Aprovado
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	Aprovado
Dr. Laércio dos Anjos Benjamin	UFV	Aprovado
Dr. Ana Tereza Bittencourt Guimarães	UNIOESTE	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2023.**

Dr^a. Elizete Rizzo Bazzoli (Orientadora)

Dr. Enrrico Bloise

Drª. Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Laércio dos Anjos Benjamin

Dr. Ana Tereza Bittencourt Guimarães



Documento assinado eletronicamente por **Ana Tereza Bittencourt Guimarães, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 09:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enrrico Bloise, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Laércio dos Anjos Benjamin, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elizete Rizzo Bazzoli, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 28/02/2023, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gleide Fernandes de Avelar, Professora do Magistério Superior**, em 02/03/2023, às 00:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2106342** e o código CRC **A9F5608A**.

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, com apoio técnico do Laboratório de Proteômica da UFMG, Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG) e do Laboratório multiusuários do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

Orientadora
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli

Suporte Financeiro

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

- A professora Dra. Elizete Rizzo pela confiança, paciência, ensinamentos e orientação durante toda minha jornada científica;
- A minha esposa, Gislene, pela força, incentivo, carinho, paciência e amor durante o desenvolvimento dessa tese;
- Ao Yves, meu grande amigo que me acompanhou durante todo o doutorado e contribuiu enormemente com os trabalhos relacionados à essa tese;
- À professora Samyra que me recebeu em seu laboratório e muito ajudou com seus ensinamentos;
- Aos professores Rafael Melo e Paula Prado pelos ensinamentos, amizade e disponibilização de material para iniciar meus trabalhos na linha de pesquisa do LabIctio;
- A Mônica Ricardo pela amizade e ensinamentos técnicos de rotina do laboratório;
- Aos amigos do laboratório de Ictiohistologia por me proporcionarem momentos incríveis e trocas de experiências: Alessandro, Ana Paula, Augusto, Camila, Cláudia, Francisco, Letícia, Lorenço, Luís e especialmente ao André.
- Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e seus coordenadores;
- Aos professores da graduação e pós-graduação pelos ensinamentos e exemplo de profissionais;
- Aos meus velhos amigos da graduação e pós-graduação;
- Aos meus familiares que sempre me apoiaram em minhas decisões. Meus pais: Dulce e Raimundo; irmã: Hellen.
- A Deus por me dar forças para seguir em frente nos momentos difíceis da minha vida.

Resumo

O acetaminofeno (ACE) é um dos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides mais utilizados no mundo e frequentemente encontrado nos ambientes aquáticos, onde pode atuar como desregulador endócrino sobre espécies não alvos como os peixes. A exposição crônica a substâncias tóxicas pode provocar alterações epigenéticas por diminuir os níveis de glutathione (GSH) e hipometilar o DNA, acarretando possíveis efeitos transgeracionais. O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de acetaminofeno na gametogênese, biologia reprodutiva e metilação do DNA gonadal de *Danio rerio* na geração parental e em sua prole F1 e F2. A gametogênese foi analisada por histologia, morfometria, proliferação celular e apoptose. Este estudo também avaliou os níveis de esteroides sexuais e prostaglandina E2 (PGE₂), expressão gênica para esteroides sexuais e receptores de PGE₂, taxa de fertilização, qualidade do sêmen, quantidade de DNA metilado e expressão das enzimas que metilam e desmetilam o DNA. Nas fêmeas da geração parental (F0), a exposição a 5 e 50 µg/L de ACE induziu folículos vitelogênicos maiores e mais abundantes, e aumentou a atresia folicular. Nesses tratamentos, os machos apresentaram menor proporção e proliferação de espermatogônias indiferenciadas, e maior quantidade de espermatogônias diferenciadas TUNEL-positivas, espermatídes e espermatozoides, resultando em menor produção espermática. O ACE aumentou o 17β-estradiol (E₂) e reduziu os níveis de 11-ketotestosterona (11-KT) nos testículos, enquanto apenas o E₂ aumentou nos ovários. Em ambos os sexos, os níveis gonadais de PGE₂ foram reduzidos. O ACE a 50 µg/L induziu aumento na expressão gênica dos receptores de andrógenos, estrógenos e PGE₂ nos ovários, e reduziu a expressão nos testículos. Os resultados também mostraram menor produção de ovos e taxa de fertilização a partir de 28 dias de exposição com redução da qualidade espermática. O tratamento resultou em redução da GSH e expressão de enzimas que metilam o DNA (DNMTs), aumento das enzimas que desmetilam o DNA (TETs), o que acarretou hipometilação global do DNA nos testículos e ovários da F0. Os ovários da F1 e F2 originados da geração F0 exposta a 50 µg/L de ACE, apresentaram menor concentração de E₂ e folículos vitelogênicos em menor quantidade, o que levou a redução de ovos liberados. Já os testículos da F1 de progenitores também expostos à 50 µg/L, apresentaram redução de 11-KT, espermatozoides menos abundantes e menor qualidade do sêmen. Os machos F2 não apresentaram alterações reprodutivas com o tratamento da F0 ao ACE. Esses resultados demonstraram que o ACE prejudica o desempenho reprodutivo do zebrafish, afetando múltiplos parâmetros reprodutivos, o que pode ser causado pela ação sinérgica do desequilíbrio dos esteroides sexuais, com redução

da PGE₂ e seus receptores. Além disso, a exposição crônica ao ACE provoca efeitos transgeracionais ao induzir alterações epigenéticas na F0 e reduzir a capacidade reprodutiva da F1 e F2 do zebrafish.

Palavras-chave: AINES; zebrafish; disruptor endócrino; gônadas; receptores de estrógeno; metilação do DNA; efeito transgeracional.

Abstract

Acetaminophen (ACE) is one of the most widely used analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs in the world, and is often found in aquatic environments, where it can act as an endocrine disruptor on non-target species such as fish. Chronic exposure to toxic substances can cause epigenetic changes by decreasing glutathione (GSH) levels and hypomethylating DNA, leading to possible transgenerational effects. The aim of this study was to analyze the effects of exposure to different concentrations of acetaminophen on gametogenesis, reproductive biology and gonadal DNA methylation of *Danio rerio* in the parental generation and in their F1 and F2 offspring. Gametogenesis was analyzed by histology, morphometry, cell proliferation and apoptosis. This study also evaluated levels of sex steroids and prostaglandin E2 (PGE₂), gene expression for sex steroids and PGE₂ receptors, fertilization rate, semen quality, amount of methylated DNA and expression of enzymes that methylate and demethylate DNA. In females of the parental generation (F0), exposure to 5 and 50 µg/L of ACE induced larger and more abundant vitellogenic follicles and increased follicular atresia. In these treatments, males showed a lower proportion and proliferation of undifferentiated spermatogonia, and a higher proportion of TUNEL-positive differentiated spermatogonia, spermatids and spermatozoa, resulting in lower sperm production. ACE increased 17β-estradiol (E₂) and reduced 11-ketotestosterone (11-KT) levels in testes, while only E₂ increased in ovaries. In both sexes, gonadal PGE₂ levels were reduced. ACE at 50 µg/L induced an increase in androgen, estrogen and PGE₂ receptors gene expression in the ovaries, and reduced expression in the testes. The results also showed lower egg production and fertilization rate after 28 days of exposure with reduced sperm quality. The treatment resulted in a reduced GSH levels and expression of DNA-methylating enzymes (DNMTs), increased in DNA-demethylating enzymes (TETs), which led to global DNA hypomethylation in the F0 testes and ovaries. The F1 and F2 ovaries derived from the F0 generation exposed to 50 µg/L of ACE, showed a lower concentration of E₂ and less vitellogenic follicles, leading to a reduction in eggs released. The F1 testes of progenitors also exposed to 50 µg/L showed a reduction in 11-KT, less abundant sperm and lower semen quality. The F2 males did not show reproductive changes with the F0 treatment to ACE. These results demonstrated that ACE impairs the reproductive performance of zebrafish, affecting multiple reproductive parameters, which may be caused by the synergistic action of sex steroid imbalance, with a reduction in PGE₂ and its receptors. Furthermore, chronic exposure to ACE may lead to transgenerational effects by inducing epigenetic changes in F0 and reducing the reproductive capacity of F1 and F2 zebrafish.

Keywords: NSAIDs; zebrafish; endocrine disruptor; gonads; estrogen receptors; DNA methylation; transgenerational effect.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Esquema simplificado mostrando as possíveis rotas de metabolização e neutralização do acetaminofeno e da N-acetyl-p-benzoquinone imine no zebrafish. Adaptado de Farrell, 2021.....16
- Figura 2: Esquema simplificado da ação das DNA metil-transferases (DNMTs) e das ten-eleven translocation (TET) sobre a metilação da citosina.....18
- Figura 3 – Visão geral do mecanismo que liga a hipometilação do DNA à metabolização de compostos tóxicos pela glutathione (GSH). Adaptado de Lee et al., 2009.....19

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	13
Gametogênese e controle hormonal da reprodução de peixes	13
Os desreguladores endócrinos	14
Efeitos metabólicos do Acetaminofeno em peixes	15
Efeitos toxicológicos sobre a metilação do DNA	17
Espécie de estudo	20
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
RESULTADOS	24
Capítulo 1	24
Capítulo 2	41
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

INTRODUÇÃO GERAL

Gametogênese e controle hormonal da reprodução de peixes

Em peixes, estímulos ambientais induzem o sistema nervoso a produzir hormônios envolvidos com a reprodução. Os estímulos são convertidos em informações sensoriais que acarretam ativação do eixo hipotálamo-pituitária-gônada (HPG), responsável por regular a gametogênese e maturação gonadal (Kah *et al.* 1993). A gametogênese é o processo no qual os gametas feminino e masculino são formados, em que ovogônias e espermatogônias diploides proliferam e gradativamente se diferenciam para formar células germinativas haploides. As ovogônias e espermatogônias se mantêm em mitose durante toda a vida reprodutiva a fim de manter a produção constante de gametas (De Rooij and Russell 2000; Lubzens *et al.* 2010). Estímulos ambientais, como temperatura e fotoperíodo, estimulam o hipotálamo a produzir e liberar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual atua na pituitária (hipófise) promovendo a liberação do hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios se ligam a receptores nas células gonadais, estimulando a produção de hormônios, proliferação e diferenciação das células germinativas e somáticas (LUBZENS *et al.*, 2010; SCHULZ *et al.*, 2010).

A proliferação das ovogônias, células pré-foliculares e formação dos folículos ovarianos em peixes ocorre sob ação do FSH e do 17β -estradiol (E_2). A produção de E_2 é dependente da presença de FSH, que induz a produção de testosterona nas células da teca e sua conversão em E_2 nas células foliculares. Os efeitos do E_2 são mediados por receptores intracelulares, receptores de estrógeno α e β ($ER\alpha$ e $ER\beta$, respectivamente) e receptores acoplados a proteína G (GPER) (NELSON; HABIBI, 2013; QIE *et al.*, 2021). A formação dos alvéolos corticais e a vitelogênese são acompanhadas pelo aumento dos níveis de E_2 que também estimula hepatócitos no fígado a produzir vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrp) incorporadas pelos folículos em fase vitelogênica (LUBZENS *et al.*, 2010). A maturação final e ovulação dependem da elevação dos níveis de LH, que resulta na síntese de progestinas, como a $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, que regulam a síntese de prostaglandinas e seus receptores nas células somáticas dos folículos maduros (TAKAHASHI; HAGIWARA; OGIWARA, 2018). As prostaglandinas, em especial a prostaglandina E_2 (PGE_2), induzem o rearranjo do citoesqueleto e ruptura das células foliculares durante a ovulação e o bloqueio de seus receptores pode inibir a ovulação no zebrafish (TANG *et al.*,

2016). Após a desova, os ovários apresentam estruturas remanescentes dos folículos ovarianos denominados folículos pós-ovulatórios e folículos atrésicos, originados da degeneração dos folículos vitelogênicos ovulados ou não ovulados, respectivamente. Folículos pós-ovulatórios são reabsorvidos em poucos dias após desova ao passo que folículos atrésicos necessitam de meses para serem totalmente removidos do ovário (DRUMMOND *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005).

Assim como o desenvolvimento dos folículos ovarianos, a espermatogênese é bem conservada entre os vertebrados e os principais hormônios envolvidos no início da espermatogênese de peixes são o FSH e andrógenos como a 11-ketotestosterona (11-KT) produzida pelas células de Leydig. Morfofuncionalmente a espermatogênese pode ser dividida em três fases: espermatogonial ou mitótica, espermatocitária ou meiótica e espermiogênica ou diferenciação (SCHULZ *et al.*, 2010). Além da 11-KT, o E₂, PGE₂, bem como outros fatores de crescimento, são necessários na fase espermatogonial e estão envolvidos com a proliferação e diferenciação de espermatogônias e células de sertoli (MORAIS *et al.*, 2017a; NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). A 11-KT pode induzir a síntese de outros mediadores que atuam no avanço da fase meiótica para a espermiogênica e a alta produção de espermatozoides está intimamente associada ao aumento de 11-KT e do receptor de andrógenos (Ar) (CROWDER; LASSITER; GORELICK, 2018; ZHENG *et al.*, 2020). A maturação final dos espermatozoides consiste em alterações morfológicas e ganho de motilidade e, além da 11-KT, as prostaglandinas desempenham um papel importante nessa fase (GOTTLIEB *et al.*, 1988). A apoptose é um mecanismo de morte celular controlada que pode ser observada em todas as fases da espermatogênese, quando ocorrer algum erro incompatível com o correto desenvolvimento celular (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009).

Os desreguladores endócrinos

Nas últimas décadas, grande atenção tem sido dada ao efeito exercido por substâncias químicas que são lançadas nos ambientes aquáticos sobre a fisiologia dos peixes. Essa situação se agrava constantemente visto que os processos de tratamento de água atualmente utilizados não são capazes de remover completamente alguns desses compostos (ADAMS *et al.*, 2002; GATIDOU *et al.*, 2007). Dentre esses compostos podemos citar os desreguladores endócrinos,

uma classe de substâncias encontradas em organismos que em condições normais não os produzem (LV *et al.*, 2016).

Os desreguladores endócrinos (EDCs – Endocrine-Disrupting Chemicals) são substâncias ou misturas exógenas que alteram a função do sistema endócrino e como consequência causam efeitos adversos a saúde de um organismo, podendo afetar também sua prole e as populações (DAMSTRA *et al.*, 2002). Os EDCs podem ter a capacidade de alterar a interação dos hormônios com seus receptores, mimetizando ou inibindo sua síntese, criando dessa forma alterações nos processos fisiológicos dos vertebrados (AL-ANSARI *et al.*, 2010; LV *et al.*, 2016). Esse grupo diverso de substâncias é constituído por organoclorados, ftalatos, pesticidas, esteroides sexuais, metais pesados, alquilfenóis, plastificantes, produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (GOODHEAD; TYLER, 2008).

Os peixes são especialmente vulneráveis aos EDCs, pois sua assimilação ocorre por múltiplas vias dentre as quais podemos citar a dieta, a respiração e o contato com o sedimento, de forma que ao longo do tempo quanto maior o nível ocupado na cadeia trófica, mais elevada é a concentração desses compostos no organismo (KWONG *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2009). Os efeitos dos EDCs nos peixes são observados no crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento afetando populações inteiras nos ambientes aquáticos (HUTCHINSON *et al.*, 2006; SCOTT; SLOMAN, 2004). Os EDCs interferem diretamente na homeostase do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal, o principal sistema responsável pelo controle da reprodução dos vertebrados, além de poder interferir na síntese, secreção e sinalização de fatores de crescimento e outros sinalizadores não hormonais (FLINT *et al.*, 2012).

Efeitos metabólicos do Acetaminofeno em peixes

O paracetamol ou acetaminofeno (ACE) é um dos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides (AINES) mais utilizados no mundo e exerce sua função inibindo a ação das cicloxigenases (COX), que catalisam a metabolização do ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs) em praticamente todos os tecidos (JOZWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014).

Assim como em outros vertebrados, em zebrafish o fígado é o principal local de metabolização do ACE, que inicia a degradação da droga por três vias: a glicoronidação, sulfatação e por hidroxilação realizada pela enzima CYP3A65, levando à produção de N-

acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), um composto altamente tóxico (VLIEGENTHART *et al.*, 2014). A formação excessiva de NAPQI após overdose de ACE induz estresse e disfunção mitocondrial, o que resulta em lesões no DNA e morte celular (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016). Em uma segunda fase de metabolização, a glutathiona (GSH) é responsável pela neutralização dos compostos gerados após a primeira fase de metabolização do ACE, levando a diminuição dos níveis de GSH (**Figura 1**). Além do fígado, outros órgãos incluindo as gônadas também possuem as enzimas necessárias para a metabolização do ACE (VLIEGENTHART *et al.*, 2014).

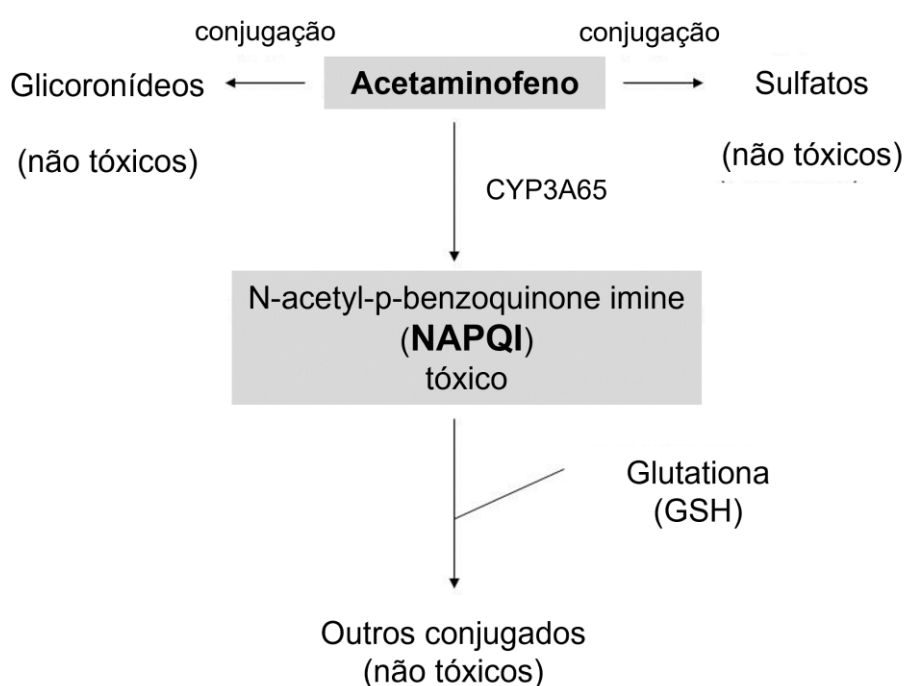


Figura 1 – Esquema simplificado mostrando as possíveis rotas de metabolização e neutralização do acetaminofeno e da N-acetyl-p-benzoquinone imine no zebrafish. Adaptado de FARRELL, 2021.

Devido à sua excreção e descarte incorreto, o ACE tem sido constantemente detectado em águas residuais urbanas em concentrações que variam de 0,1 a 13 $\mu\text{g/L}$ no sudeste do Brasil (CAMPANHA *et al.*, 2015), de 0,005 a 78 $\mu\text{g/L}$ na Europa e de 1,7 a 64 $\mu\text{g/L}$ em águas residuais da Coreia, Espanha, Bósnia e Herzegovina, Croácia e Sérvia (para revisão, ver Žur *et al.*, 2018) e em esgoto doméstico variando de 29 a 246 $\mu\text{g/L}$ na costa do Mediterrâneo (GÓMEZ *et al.*, 2007).

Além de seu efeito hepatotóxico, estudos têm mostrados efeitos adversos do ACE na reprodução. Em humanos e ratos, a ACE foi responsável pela diminuição dos níveis de

testosterona e PG, indução de estresse oxidativo nas gônadas, apoptose de células germinativas e má qualidade do esperma (AKSU *et al.*, 2016; BANIHANI, 2017; LEGRAND *et al.*, 2013). Ratas expostas ao ACE durante a gestação têm um número reduzido de células germinativas fetais, meiose atrasada em ovogônias, tamanho de ovário reduzido e efeitos transgeracionais, que levam a ovários menores e número reduzido de folículos ovarianos (Dean *et al.* 2016). Na última década, os efeitos do ACE foram investigados em condições experimentais na reprodução de peixes, com concentrações e tempos de exposição variando entre os estudos. No zebrafish, a exposição de 0,5 a 10 µg/L de ACE ou ACE combinado com outros produtos farmacêuticos, levou a redução na produção de ovos, aumento da mortalidade e anormalidades embrionárias, aumento de folículos atresicos, alterações histológicas nas gônadas (GALUS; JEYARANJAAN; *et al.*, 2013; GALUS; KIRISCHIAN; *et al.*, 2013b). Os níveis de Vtg, um clássico biomarcador induzido por EDCs estrogênicos, podem ou não ser alterados pela exposição à ACE nesta mesma espécie (AYOBAHAN *et al.*, 2020; BAUMANN *et al.*, 2020). A exposição do zebrafish ao ibuprofeno, um AINES, causou redução nos níveis de PGE₂, mas não afetou os níveis de testosterona, E₂ e Vtg (MORTHORST *et al.*, 2013). Em contraste, machos de *Rhamdia quelen* expostos a 0,25 e 2,5 µg/L ACE por 21 dias apresentaram redução nos níveis plasmáticos de testosterona e aumento de E₂ com consequente redução da atividade espermatogênica (GUILOSKI *et al.*, 2017). Dessa maneira a presença do ACE e outros AINES em ambientes aquáticos, representa um risco ambiental, pois eles podem prejudicar processos metabólicos e a homeostase hormonal em espécies não alvo e assim atuar como um EDC.

Efeitos toxicológicos sobre a metilação do DNA

A metilação do DNA é um processo biológico que consiste na adição de um grupo metil a uma base nitrogenada. A principal base nitrogenada que recebe o grupo metil é a citosina, que geralmente precede uma guanina, formando dinucleotídeos chamados de CpG (FEINBERG, 2007). As regiões promotora dos genes são conhecidas por possuir grandes sequências CpGs e a metilação das citosinas nessa região está relacionada com a repressão da transcrição gênica, uma vez que dificulta a ligação de fatores de transcrição e assim influenciando na síntese proteica (ZEMACH *et al.*, 2010).

A ligação do grupo metil à citosina é realizada por uma família de enzimas chamadas DNA metil-transferases (DNMTs). Em peixes como zebrafish, o sistema de metilação do DNA é similar ao de mamíferos, sendo catalisado principalmente pelas Dnmt1, Dnmt3,

Dnmt5, Dnmt8 (GOLL; HALPERN, 2015). A família Dnmt1 é responsável pela manutenção das metilações já existentes no DNA, enquanto Dnmt3, Dnmt4, Dnmt5, Dnmt6, Dnmt7 e Dnmt8 são responsáveis pela metilação *de novo*, estabelecendo novos padrões de metilações no DNA (GOLL; HALPERN, 2015). A desmetilação é o processo onde o grupo metil é retirado da base nitrogenada por enzimas conhecidas como ten-eleven translocation (TET) e no zebrafish são encontradas três isoformas, a Tet1, Tet2 e Tet3 (SHIMODA *et al.*, 2005) (**Figura 2**). As metilações do DNA podem ser transmitidas mitoticamente ou meioticamente para as células filhas, afetando células somáticas e germinativas e assim podem ser transmitidas para a próxima geração (OZANNE; CONSTÂNCIA, 2007).

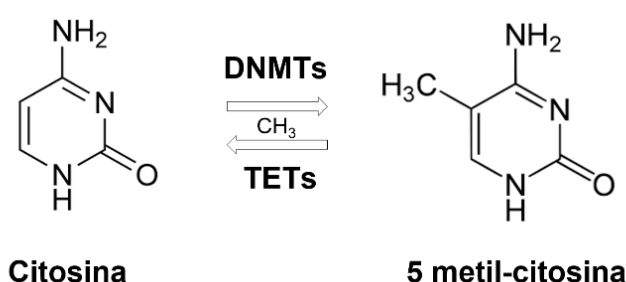


Figura 2: Esquema simplificado da ação das DNA metil-transferases (DNMTs) e das ten-eleven translocation (TET) sobre a metilação da citosina.

O padrão de metilação do DNA pode ser alterado por causa da depleção de GSH quando esta é conjugada cronicamente a substâncias químicas e seus metabólitos (LEE; JR; PORTA, 2009), tal como ocorre com o ACE. Isso acontece porque a metilação do DNA é dependente de S-Adenosilmetionina (SAM), uma molécula chave na doação do grupo metil para as metiltransferases metilar o DNA e sua síntese é suprimida quando a concentração de GSH diminui. A produção de GSH e SAM é dependente de homocisteína, mas a redução dos níveis de GSH desloca a produção de homocisteína para a produção de mais GSH, consequentemente levando a uma menor concentração de SAM (**Figura 3**) (LEE; JR; PORTA, 2009).

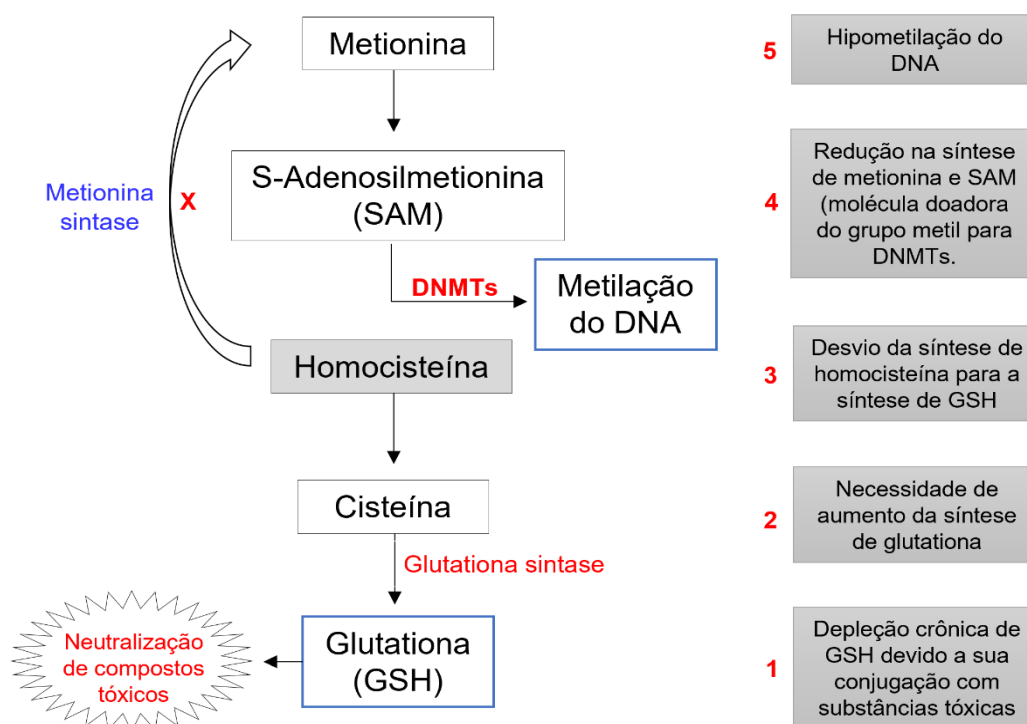


Figura 3 – Visão geral do mecanismo que liga a hipometilação do DNA à metabolização de compostos tóxicos pela glutatona (GSH). Adaptado de LEE *et al.*, 2009.

Estudos tem demonstrado que os EDCs podem induzir alterações nos padrões de metilação do DNA, e um dos mecanismos mais estudados é a sua influência nos níveis das enzimas relacionadas à metilação. Muitos estudos têm mostrado os efeitos de EDCs na expressão gênica e proteica de DNMTs, possivelmente atuando em receptores que regulam a síntese das metiltransferases. Antagonistas do receptor de andrógenos, como o vinclozolin, foi relacionado ao aumento de mRNA *Dnmt1* em ratos (COWIN *et al.*, 2010), enquanto a exposição a bisfenol-A, glifosato e triclosan foram relacionadas à redução de DNMTs e aumento de TETs, concomitante à hipometilação global no DNA em gônadas de zebrafish e medaka (LIU *et al.*, 2016; SMITH; VERA; BHANDARI, 2019; SONG; WANG; BHANDARI, 2020). Além disso, ratos expostos ao ACE durante a gestação levou a alterações no tamanho das gônadas, diminuição da fertilidade e alteração no tempo da maturação sexual das gerações parental, e da prole de primeira e segunda geração (F1 e F2 respectivamente) acometendo principalmente fêmeas (DEAN *et al.*, 2016), demonstrando que o ACE pode exercer algum efeito em gerações que não tiveram contato com o fármaco.

Espécie de estudo

O modelo experimental proposto para este trabalho é a espécie *Danio rerio*, conhecido como zebrafish, um ciprinídeo de água doce comercializado mundialmente como peixe ornamental, mas que rapidamente se tornou um dos mais utilizados modelos experimentais (HOO *et al.*, 2016). O zebrafish é considerado um consagrado modelo experimental por possuir baixo custo de manutenção em laboratório, fácil manejo, reprodução contínua de manipulação simples e genoma sequenciado. Esse animal possui dimorfismo sexual bem evidente, atinge a maturação sexual em aproximadamente 90 dias pós desova e fêmeas maduras são capazes de desovar dezenas de ovos em intervalos de 2-3 dias (AVDESH *et al.*, 2012). Por apresentar reprodução contínua, possui desenvolvimento assincrônico dos folículos ovarianos e dos cistos de células espermatogênicas (KOÇ; AYTEKIN; YÜCE, 2008). O zebrafish é o modelo mais utilizado para estudos toxicológicos na reprodução de peixes, pois possui período reprodutivo curto, transparência do corpo durante o desenvolvimento embrionário e larval, e sistema de regulação da reprodução similar ao de mamíferos (HOO *et al.*, 2016). Muitos processos metabólicos, enzimas, fatores e cofatores de reações químicas do zebrafish possuem algum correspondente em outras espécies de peixe e mamíferos, o que torna os resultados dos efeitos toxicológicos nessa espécie transponíveis, em algum grau, para roedores e humanos (VLIEGENTHART *et al.*, 2014).

JUSTIFICATIVA

Na sociedade moderna, centenas de substâncias químicas sintéticas originadas de efluentes domésticos e industrial são detectadas em ambientes aquáticos ao redor de todo o mundo. A constante exposição a diferentes substâncias químicas, incluindo os EDCs representa um risco para a biodiversidade aquática, em especial os peixes. Algumas espécies, principalmente as de pequeno porte se desenvolvem e vivem toda a vida em um mesmo ambiente, outras completam seu desenvolvimento em mais de um local e algumas realizam movimentos migratórios para reprodução, o que implica em exposição contínua ou temporária a substâncias tóxicas. Embora o efeito do ACE na reprodução de peixes tenha sido explorado anteriormente, nenhum trabalho integrou as alterações dos níveis hormonais, proliferação e morte de células germinativas, alterações histopatológicas, expressão de biomarcadores de desregulação endócrina (i.e vitelogenina e proteínas da zona radiata), alterações nos padrões de metilação do DNA nas gônadas.

Alterações epigenéticas induzidas por produtos químicos podem se tornar hereditárias ao longo de anos (ANWAY *et al.*, 2005; ANWAY; LEATHERS; SKINNER, 2006), levantando a possibilidade de algumas desordens fisiológicas crônicas estarem parcialmente relacionadas a exposições químicas em gerações anteriores. Se confirmadas e esclarecidas tais evidências serão um exemplo relevante de um desafio científico e de saúde pública para o qual a ecotoxicologia ambiental pode contribuir, permitindo pesquisas que efetivamente integrem raciocínio, métodos, evidências ambientais, moleculares e epigenéticas (PORTA *et al.*, 2008).

OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de acetaminofeno na gametogênese, biologia reprodutiva e metilação do DNA gonadal de *Danio rerio* na geração parental e em sua prole.

Para isso o projeto foi desenvolvido em duas etapas, uma com foco na geração parental (F0) (Capítulo 1) e outra na prole, primeira e segunda geração pós exposição ao ACE (F1 e F2) (Capítulo 2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1

- Avaliar os indicadores biométricos, morfofisiológicos e reprodutivos dos peixes: comprimento total, peso corporal e o índice gonadossomático (IGS);
- Analisar e quantificar as histopatologias associadas as gônadas;
- Quantificar a proporção de células germinativas de machos e fêmeas, bem como de biomarcadores de proliferação e morte celular;
- Quantificar os níveis de PGE₂, E₂ e 11-KT nos ovários e testículos, bem como dos seus receptores;
- Determinar os níveis de expressão hepática de vitelogenina e proteínas da zona radiata nos diferentes tratamentos;
- Determinar a quantidade de ovos produzidos e a taxa de fertilização durante o tempo de exposição;
- Avaliar e quantificar os principais parâmetros de qualidade espermática.

Capítulo 2

- Quantificar os níveis de glutathiona e a metilação global do DNA das gônadas da geração parental;
- Avaliar a expressão gênica de Dnmt1, Dnmt3, Dnmt5, Dnmt8, Tet1, Tet2 e Tet3 nas gônadas da geração parental;
- Determinar a quantidade de ovos produzidos e a taxa de fertilização na F1 e F2;
- Quantificar os níveis de E₂ e 11-KT nos ovários e testículos da F1 e F2.

- Avaliar e quantificar os principais parâmetros de qualidade espermática da F1 e F2.

RESULTADOS

Capítulo 1: Exposure to acetaminophen impairs gametogenesis and fertility in zebrafish (*Danio rerio*)

Artigo publicado na revista Archives of Toxicology em 2022.



Exposure to acetaminophen impairs gametogenesis and fertility in zebrafish (*Danio rerio*)

Davidson Peruci Moreira¹ · Yves Moreira Ribelro¹ · Camila Stephanie Ferrelra¹ · Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda¹ · Elizete Rizzo¹

Received: 10 August 2022 / Accepted: 21 September 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Acetaminophen (ACE; paracetamol) is one of the most widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs worldwide and is often found in aquatic systems, where it can act on nontarget species and impair fish reproduction. This study aimed to investigate the effects of chronic exposure to environmentally relevant ACE concentrations (0.5, 5 and 50 µg/L) on multiple reproductive parameters in zebrafish (*Danio rerio*). Gametogenesis was analyzed using histology, morphometry, cell proliferation, and apoptosis. This study also evaluated sex steroids, and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels, gene expression for sex steroids and PGE₂ receptors, fertilization rate, and semen quality. In females, exposure to 5 and 50 µg/L ACE induced larger and more abundant vitellogenic follicles and increased follicular atresia. In these treatments, males showed a lower proportion and proliferation of undifferentiated spermatogonia and a higher proportion of TUNEL-positive differentiated spermatogonia, spermatids, and spermatozoa, resulting in lower sperm production. ACE increased 17β-estradiol (E₂) and reduced 11-ketotestosterone levels in the testis, whereas only E₂ increased in the ovaries. In both sexes, gonadal PGE₂ levels were reduced. ACE at 50 µg/L induced an increase in the gene expression of androgen, estrogen, and PGE₂ receptors in the ovaries, and reduced expression in the testes. Results also showed lower egg production and fertilization rate from 28 days of exposure with reduced sperm quality. These results demonstrated that ACE impairs the reproductive performance of zebrafish, affecting multiple reproductive parameters, which may be caused by the synergistic action of the imbalance of sex steroids, with a reduction of PGE₂ and its receptors.

Keywords Acetaminophen · Fish · Endocrine disruptor · Subfertility · Hormones · Estrogen receptors

Introduction

Acetaminophen (ACE or N-acetyl-p-aminophenol), commercially known as paracetamol, is one of the most consumed nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) worldwide, available alone or in combination with other drugs in products used to treat colds and pain (Lau et al. 2016). ACE and other NSAIDs exert their therapeutic effects by inhibiting the action of cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) that metabolize arachidonic acid into prostaglandins (PGs) (Przybyła et al., 2021). In vertebrates, ACE metabolism occurs primarily in the liver, producing at

least two highly toxic compounds: 1,4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine (Vliegthart et al. 2014).

Due to its excretion and incorrect disposal, ACE has been constantly detected in urban wastewater at concentrations ranging from 0.1 to 13 µg/L in southeastern Brazil (Campanha et al. 2015), from 0.005 to 78 µg/L in Europe, and from 1.7 to 64 µg/L in wastewater from Korea, Spain, Bosnia and Herzegovina, Croatia, and Serbia (for review, see Žur et al. 2018) and domestic sewage ranging from 29 to 246 µg/L on the Mediterranean coast (Gómez et al. 2007). The presence of ACE in aquatic systems and other NSAIDs represents an environmental risk, as they impair metabolic processes and hormonal homeostasis in nontarget species and can act as endocrine-disrupting chemicals (EDCs). Several EDCs directly interfere with the control of vertebrate reproduction, mainly altering the synthesis of hormones and receptors that regulate gametogenesis or mimicking sex

✉ Elizete Rizzo
ictio@icb.ufmg.br

¹ Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

steroid action, resulting in reproduction disturbance (Flint et al. 2012).

In fish, gametogenesis and gonadal maturation are mainly regulated by sex steroids, such as 17 β -estradiol (E₂) and 11-ketotestosterone (11-KT), which stimulate the proliferation and differentiation of somatic and germ cells (Lubzens et al. 2010; Schulz et al. 2010). The effects of these sex steroids are mediated by intracellular receptors [estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) and androgen receptors (AR)], which act as transcription factors when activated by the ligand (Nelson and Habibi 2013). Under special conditions, G protein-coupled receptors (GPER) can act as an alternative signaling pathway for the rapid and effective response after exposure to environmental estrogens (Qie et al. 2021). In addition, PGs, especially prostaglandin E₂ (PGE₂) produced locally in the gonads, are important mediators that act on oocyte maturation, ovulation, and spermatogonia self-renewal through activation of PGE₂ receptors, such as Ptger2a and Ptger4b (Takahashi et al. 2018; Crespo et al. 2020; Baker et al. 2021). Nevertheless, the role of PG inhibitors, such as ACE, on sex steroid levels associated with the expression of their receptors is not well known, especially in fish gonads.

In addition to its hepatotoxic effect, studies have demonstrated adverse outcomes of ACE on reproduction. In humans and rats, ACE is responsible for decreased testosterone and PG levels, induction of oxidative stress in the gonads, germ cell apoptosis, and poor sperm quality (Legrand et al. 2013; Aksu et al. 2016; Banihani 2017). Rats exposed to ACE during pregnancy have a reduced number of fetal germ cells, delayed meiosis in oogonia, reduced ovary size, and transgenerational effects, such as smaller ovaries and a reduced number of ovarian follicles (Dean et al. 2016). In the last decade, the effects of ACE have been investigated under experimental conditions on fish reproduction, with concentrations and exposure times varying between studies. In zebrafish, a reduction in egg production was associated with increased embryo mortality and abnormality, and histological alterations in the gonads have been reported (Galus et al. 2013a, b). Levels of vitellogenin (Vtg), a classic biomarker caused by estrogenic EDCs, may or may not be altered by ACE exposure in this same species (Ayobahan et al. 2020; Baumann et al. 2020), but E₂ and 11-KT levels were not reported.

Despite some studies in recent years, the action of environmentally relevant ACE concentrations on reproductive biology is not well known, especially in teleost fish. To better explore the potential ecological risks of ACE contamination, this study investigated the effects of chronic exposure to ACE on gametogenesis, gonadal maturation, sex steroids, and PGE₂ levels as well as gene expression of their receptors in zebrafish *Danio rerio*, a versatile model for reproduction research in vertebrates. For a more complete and integrated

analysis of reproduction, this study also evaluated spawning, fertilization rate, and sperm motility.

Materials and methods

The procedures with animals performed in this study followed the principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais (protocol no. 115/2020).

Fish storage conditions and pre-experimentation phase

Specimens of wild-type strain zebrafish *D. rerio* aged 120 days were obtained from a local commercial supplier (EcoFish Aquários e Lagos Ltda.) and kept in 12 tanks with 20 L (15 females and 15 males/aquarium) at 26–28 °C with 12 h light/12 h dark photoperiod and water recirculation system. To maintain water quality (pH 7–8, dissolved O₂ \geq 6 mg/L, and NH₃ \leq 0.025 mg/L), ~30% of the water was renewed daily with dechlorinated water supplemented with pH buffer 7.0 (Neutral Regulator 7.0; Seachem Laboratories, Inc.). Fishes were fed ad libitum daily with commercial food (Tetramin Tropical Flakes; Tetra, USA; four times daily) and adult brine shrimp (once daily). The animals were kept for 30 days under these conditions before the beginning of the experiment. During this period, spawning was monitored once weekly using an egg collection box that covers ~40% of the bottom surface of each aquarium. After this period and guaranteed the reproductive activity of fish, they were submitted to the experimental conditions.

Exposure to ACE

Fishes were subjected in triplicate tanks to the following ACE concentrations (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): 0 (control), 0.5 μ g/L (low), 5 μ g/L (medium), and 50 μ g/L (high) dissolved in dechlorinated water for 60 days. The tanks were kept without filters in the recirculation system. The physicochemical parameters (temperature, pH, oxygen, and toxic ammonia) were monitored daily to maintain the water quality (Table 1). Every 2 days, each tank had 90% of the water renewed with the appropriate nominal ACE concentrations. Spawning was monitored 1 day before the exposure phase and every 7 days after starting ACE treatment. After 60 days of exposure, fishes were anesthetized with eugenol and euthanized by the cross-section of the cervical spine. Total length, body weight (BW), and gonad weight (GW) were obtained, and the gonadosomatic index (GSI = GW/BW \times 100) was calculated. Gonads and liver were collected for histological and molecular analyses.

Table 1 Water quality parameters and acetaminophen (ACE) concentrations during zebrafish exposure to different ACE concentrations

	Control	0.5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Temperature (°C)*	28.1±0.3	27.4±0.2	27.5±0.2	27.4±0.2
pH*	7.64±0.07	7.79±0.04	7.79±0.04	7.75±0.03
Oxygen (mg/L)*	6.84±0.22	6.43±0.24	6.69±0.25	6.69±0.23
Ammonia (mg/L)*	0.026±0.008	0.019±0.002	0.018±0.002	0.025±0.008
ACE (µg/L)	ND	0.43±0.05	4.58±0.46	45.13±2.81

Values represents mean ± SE

ND not detected

*No significant difference between treatments, $p > 0.05$

Testes of six specimens (two per tank) from each group were also collected for immediate semen analysis.

Quantification of ACE in the water

To analyze the real ACE concentration during the experiment, 10 mL water samples from each tank were stored in amber glass flasks before water renewal at the beginning (day 2), middle (day 32), and end (day 58) of the experiment and kept at -20°C . For the analyses, the water samples were filtered using a syringe filter with a 30 mm membrane and 0.22 µm pore, concentrated 10 times in a vacuum concentrator centrifuge (UniEquip Univapo 100H), and later analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time of flight (TOF)/TOF-mass spectrometry (MS). The ACE standard was the same for the fish exposure phase (Sigma-Aldrich; with > 99% purity). Briefly, 400 µl of each concentrated water sample was inserted into a Shimadzu HPLC 20A Prominence, with a C₁₈ column (250×4.6×2 mm; Kromasil Eternity) to separate the compounds. After separation, the compounds passed through an ultraviolet-visible detector before fractions were collected to confirm their masses by MS. The mobile phase used was acetonitrile (A) and 0.1% trifluoroacetic acid (B) operating in an elution gradient at the maximum rate of 1 mL/min. The reverse phase was performed by gradient according to the following program: 5–30% B in 20 min, 30–100% B in 2 min, maintained at 100% B for 2 min, ending with a reduction to 5% B in 2 min. To confirm the mass of ACE (151.6 g/mol), the collected compounds were analyzed in a MALDI-TOF/TOF Bruker Autoflex III smart beam spectrometer equipped with an Nd:YAG laser (330–360, 495–540, 808, and 990–1080 nm). For this, 0.5 µl of the fractionated sample was applied to an MTP Anchor Chip Var/384 plate and added together with 0.5 µl α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, followed by drying at room temperature. Ions were monitored in positive reflected mode with a detection window between 80 and 1000 Da, and the obtained ACE mass was 152.523 m/z [ACE +H]⁺. The ACE concentration measured in the water during exposure was 86%, the nominal concentration for

the 0.5 µg/L group, 91.6% for the 5 µg/L group, and 90.3% for the 50 µg/L group (Table 1). The detection limit of ACE was 0.16 µg/L.

Histology and morphometry of gametogenesis

To analyze gametogenesis, the gonads ($n = 6/\text{sex}/\text{treatment}$) were fixed in Bouin's fluid for 12 h and kept in 70% ethanol. For histology, the samples were gradually dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness, and stained with hematoxylin–eosin. Morphometric analyses were performed on histological sections of gonads of six fish from each group according to Weber et al. (2017, 2019). To quantify the proportion (%) of ovarian follicles, five fields from different histological sections 250 µm distance each ($n = 30$ fields/treatment) were randomly chosen and photographed at ×100 magnification using an image analysis tool (Carl Zeiss AxioVision SE64 software) attached to a light microscope. The images were analyzed using ImageJ 1.4.9 (National Institutes of Health) by superimposing a grid with 540 equidistant points over each image. In females, the incident points on the following elements were quantified: oogonia (Oo), early (PN1) and advanced (PN2) perinucleolar follicles, cortical vesicle follicles (CV), vitellogenic follicles (VF), postovulatory follicles (FPO), atretic follicles (AF), and connective tissue and proteinaceous fluid. The diameter of mature VF was measured in histological sections of six fishes per treatment, and 120 follicles were analyzed per treatment, each measurement being the average of the largest and smallest diameter of the VF.

In males, quantification of testicular components was carried out in histological sections at ×400 magnification. The proportion (%) of undifferentiated (A_{und}) and differentiated type A (A_{diff}) spermatogonia, type B spermatogonia (G_B), primary (C₁) and secondary (C₂) spermatocytes, spermatids (T), spermatozoa (Z), seminiferous tubule (ST) lumen, Sertoli cells (Sc), Leydig cells (Lc), interstitial tissue, and areas with testicular disorganization were quantified. The ST diameter was measured in histological sections of six fish per treatment, and 120 STs were analyzed per treatment, each

measurement being the average of the largest and smallest diameters of ST.

Cell proliferation and apoptosis

Cell proliferation was assessed by immunohistochemistry using proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Before reaction, histological sections of gonads were subjected to gene retrieval using sodium citrate buffer (pH 6.0) at 95 °C for 30 min. Bovine serum albumin (BSA; 2%) and hydrogen peroxide (H₂O₂; 3%) were used to block nonspecific reactions and remove endogenous peroxidase, respectively. For immunoperoxidase, sections were incubated overnight at 4 °C with monoclonal anti-PCNA primary antibody (Sigma-Aldrich; P8825) diluted in 2% BSA, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and incubated with secondary antibody (DAKO EnVision System, horseradish peroxidase; DakoCytomation) for 30 min at room temperature. The peroxidase reaction was revealed with diaminobenzidine (DAB), and the sections were counterstained with hematoxylin. As a negative control, some sections were not incubated with the primary antibody.

To assess apoptosis, in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was performed using the ApopTag Plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (Merck Millipore) according to Moreira et al. (2020). Briefly, sections were deparaffinized, washed with PBS (pH 7.4), and treated with 20 mg/mL proteinase K diluted in PBS for 15 min at room temperature. To remove endogenous peroxidase, sections were incubated with 3% H₂O₂ for 5 min at room temperature. The sections were incubated with the enzyme TdT for 1 h at 37 °C and incubated for 30 min at room temperature with an anti-digoxigenin conjugate. The peroxidase reaction was detected with DAB, and the sections were counterstained with hematoxylin. As a negative control, some sections were incubated without the TdT enzyme.

The quantification of the labeled follicles in PCNA and TUNEL reactions followed a previously established protocol (Melo et al. 2015). For this, 30 histological sections from six animals were examined per group. Ovarian follicles with labeled cells were considered PCNA or TUNEL-positive, and the results were expressed as the percentage of labeled follicles at each development stage (PN1, PN2, CV, VF, FPO, and AF). In males, quantification of PCNA and TUNEL-positive germ cells was also conducted, and 30 histological images from six animals per treatment were analyzed. A 540-point graticule was superimposed on each image acquired at $\times 400$ magnification. Incident points on labeled and unlabeled cells were considered, and the results were expressed as the percentage of labeled cells per treatment.

Sex steroids and PGE₂

To assess E₂, 11-KT, and PGE₂ concentrations, the gonad samples ($n = 6/\text{sex}/\text{group}$) were stored in liquid nitrogen and subsequently subjected to an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The samples were homogenized in an extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 0.002% aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] in a 1:2 tissue/buffer ratio. The extracts were vortexed and centrifuged at 15,000 $\times g$ for 60 min at 4 °C, and the supernatant was collected for analysis. Gonadal E₂, 11-KT, and PGE₂ concentrations were determined by ELISA according to the manufacturer's guidelines (Cayman Chemical ELISA kit E₂ #582251, 11-KT #582751, and PGE₂ #500141). The sensitivity of the assays was 6.6 pg/mL (E₂), 0.8 pg/mL (11-KT), and 15.6 pg/mL (PGE₂).

Vitellogenin (Vtg) and zona radiata proteins (Zrp)

To verify whether ACE affects the expression of EDC biomarkers, liver samples ($n = 6/\text{sex}/\text{group}$) stored in liquid nitrogen were subjected to indirect ELISA to detect Vtg and Zrp (Weber et al. 2017). The liver samples were homogenized, and the supernatant was obtained as described in "Vitellogenin (Vtg) and zona radiata proteins (Zrp)". The total protein concentration of each sample was determined by the method of Bradford (1976) using BSA as a standard. Duplicate samples were incubated overnight at 4 °C in 96-well microplates (Nunc, Denmark), washed with 0.05% PBS-Tween, blocked for 2 h with 2% BSA, and incubated with rabbit anti-salmon Vtg and Zrp polyclonal antibodies (Biosense Laboratories AS, Norway) at 1:500 dilution for 2 h at 37 °C. After washing, the plates were incubated with anti-rabbit IgG secondary antibody (Sigma-Aldrich) conjugated to peroxidase at 1:1000 dilution for 2 h at 37 °C. The plates were washed again, and the reaction was developed with 200 μl o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) diluted in 0.05 M sodium citrate buffer containing 0.00025% H₂O₂ for 20 min. The reaction was stopped by adding 50 μl of 2 M H₂SO₄ to each well, and the absorbance was measured at 492 nm in a spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc.). For the control and validation of ELISA, a liver homogenate dilution curve was conducted for each analyzed protein, with correlation values of $R^2 = 0.9915$ for Vtg and $R^2 = 0.9831$ for Zrp.

RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

To quantify the gene expression for androgen (*ar*), estrogens (*Era*, *Er β* and *gper*), and PGE₂ (*Ptger2a* and *Ptger4b*) receptors, RNA from six gonads per sex per treatment was isolated using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich) according to

the manufacturer's guidelines. Total RNA was quantified using a Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 60 ng RNA was reverse transcribed to cDNA using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's recommendations. The resulting cDNA was subjected to qRT-PCR using the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a Rotor-Gene Q thermal cycler (Qiagen, Hilden, Germany), and the reaction cycles followed the manufacturer's recommendations. The primers used for qRT-PCR are listed in Table 2. The relative levels of gene expression were determined by normalization to *18S rRNA* and *actb2* using the $\Delta\Delta CT$ method, and the results are presented as a fold increase in relation to the control group (Taylor et al. 2019).

Spawning and egg fertilization

Spawned eggs were obtained every 7 days, placing an egg collector box kept overnight in each tank. The next morning, the box was removed, and viable and nonviable eggs were counted within 4–6 h after spawning. With the aid of a stereomicroscope, translucent embryos in a well-developed blastodisc phase were counted as fertilized, whereas opaque eggs with clotted material were considered unviable (Poleo et al. 2001). The number of spawned eggs and the fertilization rates (%) were calculated every 7 days from 0 to 54 days after spawning for each group, in triplicate.

Sperm quality

To analyze sperm quality, semen samples from six fishes per treatment were obtained after gentle massage of the testes in Hank's balanced solution at a concentration of 1:50 weight/volume. After 10 min, the samples were activated with distilled water and analyzed with the aid of a Makler chamber and a phase-contrast microscope equipped with a heated plate at 28 °C coupled to a computer-assisted semen analysis (CASA) model Sperm Class Analyzer version 4.0 (Analysis

Laboratory; Microptic SL, Barcelona, Spain). The following parameters were evaluated: progressive and nonprogressive motility, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), and straight-line velocity (VSL) with 15, 30, 45, 60, and 180 s after activation.

Statistical analysis

GraphPad Prism 5 software was used for statistical analyses. The normality of data was tested using the Lilliefors test. Spawning and fertilization rates were assessed using the *t* test, comparing each ACE-treated group to the control group. One-way analysis of variance (ANOVA) test with Tukey's post-hoc test or nonparametric Kruskal–Wallis followed by Dunn's post-hoc test was used to analyze water quality and semen quality parameters, gametogenesis morphometric data, ELISA, and receptor gene expression. Data were expressed as the geometric mean \pm standard error (SE) in qRT-PCR results and mean \pm SE for all other results, and differences were considered significant with $p < 0.05$.

Results

Histological analysis and proportion of germ cells

To assess gametogenesis and gonadal development in zebrafish, the GSI, proportion of germ cells, and developmental alterations that could affect gonadal physiology were quantified. The treatment did not induce significant differences in the total length and BW of the animals of both sexes. In females, GSI was significantly higher in all ACE-treated groups compared to the control group ($p = 0.0003$; Table 3). Histological analyses showed that VFs were larger and more abundant in the ovaries of 5 and 50 $\mu\text{g/L}$ ACE-treated fish, whereas FPOs were less abundant. These groups also had a lower proportion of Oo, PN1, PN2, and CV. Furthermore, treatment with ACE resulted in a higher

Table 2 Primers used in real time RT-PCR analysis for estrogen (*era*, *erf1*, *erf2*, *gper*), androgens (*ar*), prostaglandin E2 (*ptger2a*, *ptger4b*) receptors and reference (*18S rRNA*, *actb2*) genes in zebrafish gonads after 60 days exposure to different concentrations of acetaminophen

Gene	Forward sequence	Reverse sequence	References
<i>era</i>	GACTACGCCTCTGGATATCATTAC	TGGTCGCTGGACAAACATAG	Bertotto et al. (2018)
<i>erf1</i>	CTCTCAGCACCTCTTTCCCTTC	CCGCCCTAGAAATACAGCTAAC	Bertotto et al. (2018)
<i>erf2</i>	GTCCGAGGTCTCAAGAGATAAAG	CTTCCATGATCCGGGAGATTAG	Bertotto et al. (2018)
<i>gper</i>	TGGCTGTGGCAGATCTTATTC	CAATGGACTGCTGCTCATAGA	González-Rojo et al. (2019)
<i>ar</i>	ACGTGCCGTGGCGTGA AAA	CAAACCTGCCATCCGTGAAC	Crespo et al. (2020)
<i>ptger2a</i>	CTGTGGTTCAAACGGCGTATTT	ACACACCGCATGAGTCTTGCT	Crespo et al. (2020)
<i>ptger4b</i>	GTGCTCATCTGCTCCACTCCTT	GCAGAGTTAAACAGCTGGTTTACA	Crespo et al. (2020)
18S rRNA	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	CGGACATCTAAGGGCATCAC	González-Rojo et al. (2019)
<i>actb2</i>	CGAGCTGTCTTCCATCCA	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	Riesco and Robles (2013)

Table 3 Biometric data, gonadosomatic index, vitellogenic follicle diameter, and proportion (%) of follicles at different stages of development and proteinaceous fluid in female zebrafish after 60 days of exposure to different Acetaminophen (ACE) concentrations

	Control	0.5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Total length (cm)	4.12 ± 0.10 ^a	4.24 ± 0.08 ^a	4.21 ± 0.08 ^a	4.23 ± 0.08 ^a
Body weight (g)	0.84 ± 0.06 ^a	1.01 ± 0.07 ^a	0.84 ± 0.04 ^a	0.86 ± 0.05 ^a
Gonadosomatic index (GSI)	10.55 ± 1.01 ^b	12.56 ± 1.14 ^{ab}	15.66 ± 1.10 ^a	16.40 ± 0.97 ^a
Vitellogenic follicle diameter (µm)	490.0 ± 4.6 ^c	515.1 ± 5.5 ^b	551.1 ± 4.0 ^a	563.3 ± 3.5 ^a
Oogonia	0.21 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.04 ^{ab}	0.06 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.02 ^b
Initial perinucleolar follicles	3.58 ± 0.47 ^a	2.78 ± 0.61 ^{ab}	1.47 ± 0.26 ^b	1.91 ± 0.28 ^b
Advanced perinucleolar follicles	7.14 ± 0.82 ^a	5.41 ± 0.65 ^a	2.90 ± 0.53 ^b	5.09 ± 0.84 ^{ab}
Follicle with cortical alveoli	21.41 ± 1.89 ^a	15.46 ± 1.37 ^{ab}	8.68 ± 1.10 ^c	12.08 ± 1.18 ^{bc}
Vitellogenic follicles	54.86 ± 3.11 ^c	61.05 ± 2.85 ^{bc}	74.37 ± 1.88 ^a	65.38 ± 2.78 ^{ab}
Post-ovulatory follicles	1.67 ± 0.38 ^a	1.29 ± 0.29 ^a	0.21 ± 0.14 ^b	0.51 ± 0.23 ^b
Atretic follicles	0.62 ± 0.39 ^b	4.15 ± 1.02 ^a	5.91 ± 1.30 ^a	5.51 ± 1.89 ^a
Interstitial tissue	10.45 ± 1.05 ^a	7.29 ± 0.73 ^{ab}	4.92 ± 0.69 ^b	7.59 ± 0.90 ^{ab}
Proteinaceous fluid	0.05 ± 0.02 ^b	2.41 ± 0.75 ^a	1.45 ± 0.24 ^a	1.87 ± 0.43 ^a

Values represents mean ± standard error. In each line, different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$)

proportion of AF than the control group in all treated groups ($p = 0.0022$). The only histopathology found in the ovaries was the presence of proteinaceous fluid in the interstitial tissue between the ovarian follicles, which was more abundant in ACE-treated fish ($p < 0.0001$; Fig. 1a–d).

In the testis, there was a significant reduction in GSI, ST diameter, and number of Z and an increase of T in 5 and 50 µg/L ACE-treated fish (Fig. 1e–h; Table 4). In addition, ACE-treated fish showed a lower proportion of A_{und} ($p = 0.0052$) and a greater amount of A_{diff} ($p = 0.0007$). Some testes of animals exposed to 5 and 50 µg/L ACE showed different levels of disorganization in the testicular structure, with disrupted spermatogenic cysts. No significant changes were observed in the amount of G_B , Sc, Lg, ST lumen, and interstitial tissue in ACE-treated fish ($p > 0.05$).

Cell proliferation and apoptosis

Based on germ cell proportion, cell proliferation and apoptosis were further investigated in the ovaries and testis. In females, PCNA-positive reactions were observed mainly in Oo, oocyte nuclei and follicular cells from follicles at different developmental stages (Fig. 2a–d). Regarding TUNEL-positive reactions, follicles at all stages of development showed a positive reaction on follicular cells (Fig. 2e–h). In males, apart from T and Z, all other germ cells showed positive reactions to PCNA (Fig. 2i–l). Considering TUNEL reaction, except for A_{und} , G_B , and C_2 , all other germline and somatic cells analyzed showed positive reaction (Fig. 2m–p).

In the ovaries of animals treated with 5 and 50 µg/L ACE, a lower proportion of PCNA-positive reactions in Oo was observed compared to the control group ($p = 0.004$; Fig. 3a). There are no statistical differences in the ovarian follicles that showed PCNA labeling in oocyte nuclei and/or

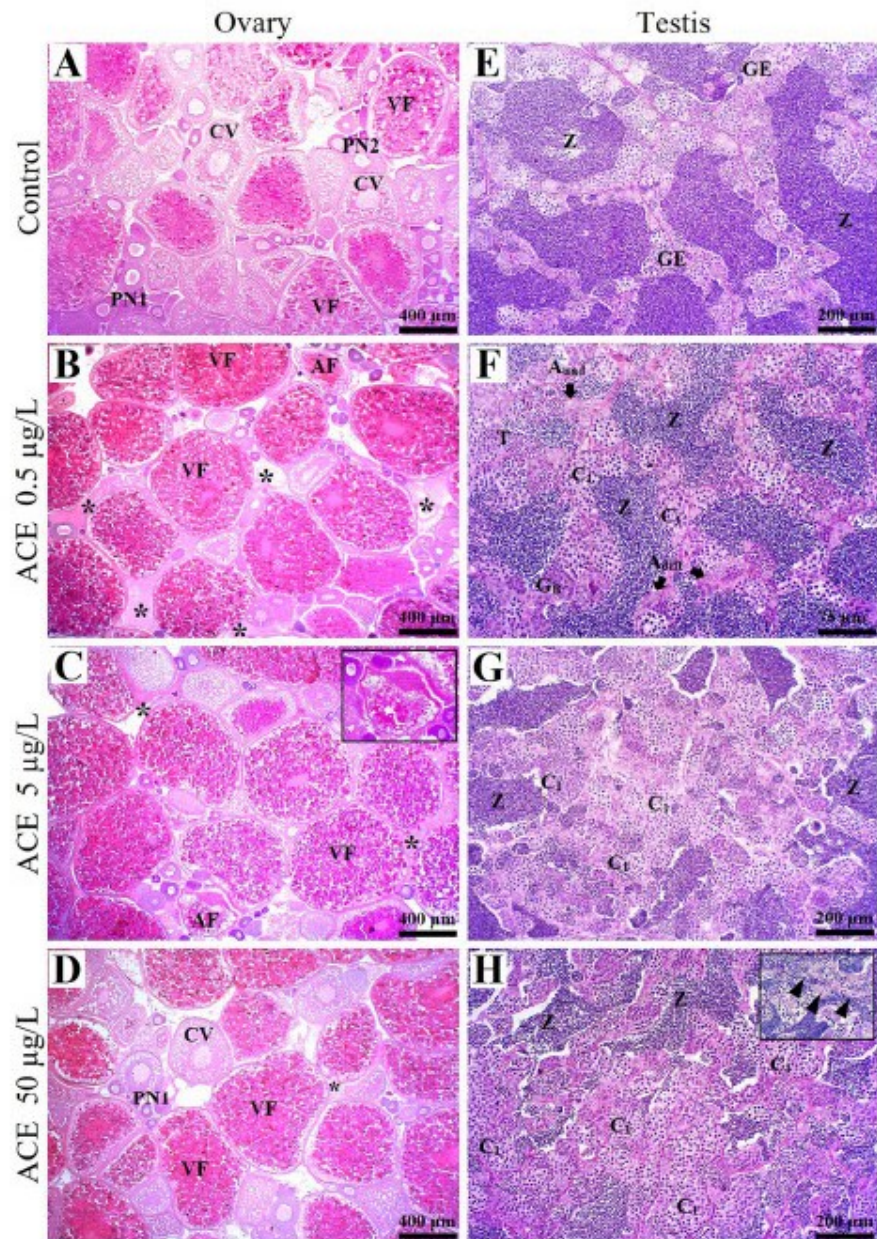
follicular cells. A low proportion of TUNEL-positive PN1/PN2 (< 10%) was found in all groups, whereas VF were significantly more labeled in animals treated with 5 and 50 µg/L ACE ($p = 0.0234$; Fig. 3b), indicating that ACE can induce an increase in the apoptosis of follicular cells during vitellogenesis. All FPO and AF had TUNEL-positive follicular cells.

In the testis of animals exposed to 5 and 50 µg/L ACE, there was a lower proportion of A_{und} PCNA-positive, indicating inhibition of cell proliferation at this developmental stage ($p = 0.0166$; Fig. 3c). A higher proportion of TUNEL-positive reaction was observed for A_{diff} ($p = 0.0022$), T ($p = 0.0196$), and Z ($p = 0.0117$) in fish exposed to 5 and 50 µg/L ACE (Fig. 3d), but no significant difference was found for C_1 , Sc, and Lg.

E_2 , 11-KT, and PGE₂ levels

To analyze the gonadal physiology, the gonadal concentrations of two main sex steroids (E_2 and 11-KT) in fish were evaluated. In addition, to check the effects of ACE on PGs, gonadal PGE₂ was also evaluated. Results showed that ACE exposure led to changes in gonadal E_2 concentrations, with a significant increase at 50 µg/L ACE in the ovaries ($p = 0.0088$) and 5 and 50 µg/L ACE in the testis ($p = 0.0078$; Fig. 4a). In males, 11-KT testicular levels were lower at 5 and 50 µg/L ACE compared to the control group ($p = 0.0109$), but no significant difference was found for this sex steroid in ovaries (Fig. 4b). Regarding PGE₂, a significant reduction of its concentrations was detected at 5 and 50 µg/L ACE compared to the control group in both sexes, with values being 3–4 times higher in the ovaries than in the testes of zebrafish (Fig. 4c).

Fig. 1 Histological sections of ovary and testis of zebrafish exposed to different concentrations of acetaminophen (ACE) for 60 days (Hematoxylin and eosin). **A** normal ovary, **B–D** ACE treatment led to a decreased amount of early (PN1) and advanced (PN2) perinucleolar, and with cortical vesicle (VC) follicles, increased number of atretic follicles (AF), and induced the emergence of larger vitellogenic follicles (VF), and proteinaceous fluid (*). **E** normal testis, **F–H** Treatment with ACE induced alterations in the proportions of undifferentiated (A_{und}), differentiated (A_{diff}) spermatogonia, but not type B spermatogonia, primary spermatocytes (C_1) and spermatids (T), which led to lower spermatozoa (Z) production. Detail of atretic follicle (insert C) and testis disorganization (arrowhead; insert H)



Gene expression for Androgens, estrogens, and PGE₂ receptors

To check whether ACE exposure affects the gene expression of sex steroid and PGE₂ receptors, *ar*, *era*, *erβ1*, *erβ2*, *gper*, *ptger2a*, and *ptger4b* mRNA was quantified in the ovaries and testes. ACE treatment significantly increased ovarian transcript levels of *era* in all treated groups and *erβ1*, *erβ2*, *gper*, and *ar* at 50 µg/L ACE ($p < 0.05$).

Moreover, PGE₂ levels decreased at 5 and 50 µg/L ACE, but upregulation of their receptors (*ptger2a* and *ptger4b*) was observed at 50 µg/L ACE in the ovaries (Fig. 4d–j).

In males, downregulation of *ar*, *ptger2a*, and *ptger4b* was observed ($p < 0.05$). Interestingly, although ACE treatment increased E₂ levels in zebrafish testes, *era*, *erβ1*, and *erβ2* had a reduction in the levels of their transcripts, again at 50 µg/L ACE ($p < 0.05$). *gper* mRNA had no significant difference among treatments.

Table 4 Biometric data, gonadosomatic index, seminiferous tubule diameter and proportion (%) of germ cells in male zebrafish after 60 days of exposure to different Acetaminophen (ACE) concentrations

	Control	0.5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Total length (cm)	3.82 ± 0.50 ^a	3.90 ± 0.60 ^a	4.03 ± 0.07 ^a	3.91 ± 0.04 ^a
Body weight (g)	0.62 ± 0.02 ^a	0.59 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.02 ^a
Gonadosomatic index (GSI)	1.50 ± 0.18 ^a	1.14 ± 0.11 ^{ab}	1.09 ± 0.16 ^b	0.99 ± 0.08 ^b
Seminiferous tubule diameter (µm)	149.4 ± 2.6 ^{ab}	154.0 ± 4.0 ^b	139.5 ± 4.0 ^a	133.3 ± 3.8 ^a
Undifferentiated A spermatogonia	0.55 ± 0.09 ^a	0.48 ± 0.14 ^{ab}	0.18 ± 0.04 ^b	0.18 ± 0.04 ^b
Differentiated A spermatogonia	4.63 ± 0.51 ^b	6.78 ± 0.49 ^a	7.57 ± 0.60 ^a	7.37 ± 0.68 ^a
Spermatogonia B	9.57 ± 0.85 ^a	10.73 ± 0.86 ^a	9.42 ± 0.90 ^a	12.60 ± 1.23 ^a
Primary spermatocytes	22.96 ± 1.30 ^{ab}	20.71 ± 1.71 ^b	26.86 ± 1.53 ^a	26.48 ± 1.03 ^a
Secondary spermatocytes	2.06 ± 0.40 ^a	1.00 ± 0.21 ^{ab}	1.38 ± 0.33 ^{ab}	0.69 ± 0.17 ^b
Spermatids	7.93 ± 0.63 ^b	7.93 ± 0.64 ^b	11.41 ± 0.87 ^a	11.40 ± 0.71 ^a
Spermatozoa	44.16 ± 2.56 ^a	43.78 ± 2.66 ^a	34.43 ± 2.83 ^{ab}	30.67 ± 2.24 ^b
Sertoli cells	2.19 ± 0.14 ^a	1.96 ± 0.14 ^a	1.88 ± 0.11 ^a	2.04 ± 0.21 ^a
Leydig cells	1.20 ± 0.15 ^a	0.86 ± 0.16 ^a	0.93 ± 0.11 ^a	1.12 ± 0.14 ^a
Seminiferous tubule lumen	4.08 ± 0.42 ^a	4.74 ± 0.37 ^a	4.67 ± 0.44 ^a	4.86 ± 0.53 ^a
Interstitial tissue	0.67 ± 0.19 ^a	1.03 ± 0.50 ^a	0.95 ± 0.24 ^a	1.45 ± 0.38 ^a
Testicular disorganization	ND	ND	0.32 ± 0.14 ^b	1.14 ± 0.52 ^a

Values represent mean ± standard error. In each line, different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$)

ND not detected

EDC biomarkers

The hepatic production of Vtg and Zrp, two classic biomarkers of endocrine disruption in fish, was investigated. Females showed significantly reduced levels of Vtg ($p = 0.0073$) and Zrp ($p = 0.0344$) at 50 µg/L ACE (Fig. 4k and l), whereas exposure to ACE in males did not result in significant changes in their hepatic levels ($p > 0.05$).

Spawning and embryo production

To examine the effects of ACE exposure on zebrafish reproduction, weekly egg production and fertilization rate were assessed in each group. Results showed a significant reduction in the number of spawned eggs from 28 days of exposure at 50 µg/L ACE ($p = 0.001$) and from 42 days to 5 µg/L ACE ($p = 0.024$), accompanied by a reduction in the egg fertilization rate (Fig. 5).

Sperm quality

To verify whether sperm quality could have influenced the fertilization rates in zebrafish, the key parameters of sperm motility were evaluated. From the parameters reported by the CASA system, a reduction in progressive motility was identified in the first 45 s after activation of sperm from animals exposed to 50 µg/L ACE ($p = 0.039$; Table 5). Consequently, the amount of nonprogressive Z was higher in the first 60 s for this group and fish exposed to 5 µg/L ACE. As expected, the percentage of Z with motility was close to

1% in all groups at 3 min after sperm activation. Regarding velocity parameters, treatment reduced the VSL at 50 µg/L ACE, with a significant difference at 15, 45, and 180 s after sperm activation. In addition, there was a significant reduction in VAP after 30 s in 50 µg/L ACE and no changes in VCL of Z. Taken together, these results indicated that ACE at 50 µg/L not only reduces the number of Z able to travel along a straight path but also reduces the speed at which they travel along this path.

Discussion

Chronic exposure to pharmaceutical products, often found in environmental sewage discharges at low concentrations, has been little studied; thus, its effects remain largely neglected by public health and environmental organizations. This study investigated the chronic exposure of ACE on gametogenesis and reproduction of zebrafish. This study also assessed several reproductive parameters, gene expression of hormonal receptors, and embryo production and reported that environmentally relevant ACE concentrations impair several stages of biological organization in fish gonads.

Like other NSAIDs, ACE is a classic inhibitor of PG synthesis, which is an important factor in fish ovulation (Takahashi et al. 2018). In this study, chronic exposure (60 days) to 0.5 µg/L ACE, a concentration found in urban wastewater in southeastern Brazil (Campanha et al. 2015), significantly reduced ovarian levels of PGE₂; however, deleterious effects were more pronounced on 5 and 50 µg/L ACE-treated fish.

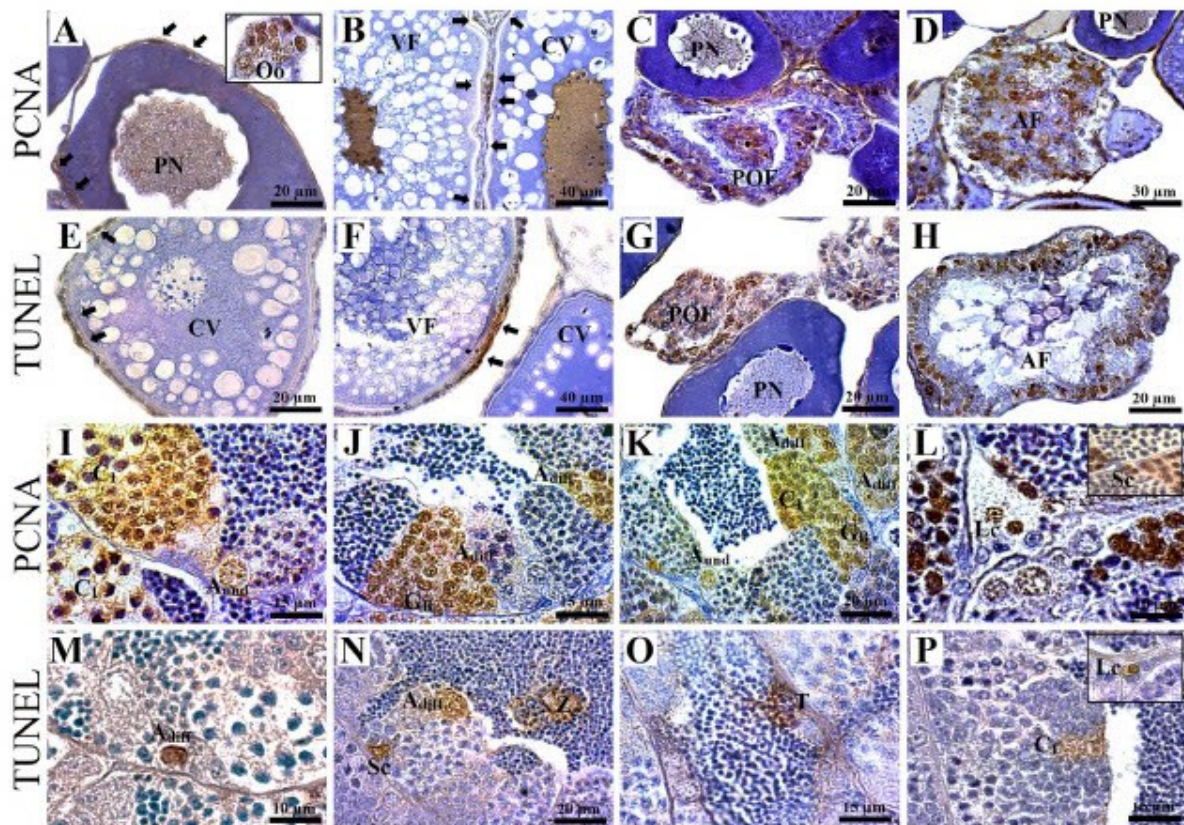


Fig. 2 PCNA and TUNEL-positive reactions counterstained with hematoxylin, indicating cell proliferation and apoptosis respectively, in ovarian follicles (A–H) and testicular cells (I–P) of zebrafish exposed to acetaminophen for 60 days. A–D PCNA-positive reaction was observed mainly in the nucleus of oogonia (Oo) and oocytes of the perinucleolar (PN), with cortical vesicles (CV) and vitellogenic follicles (VF). Proliferative activity of follicular cells (arrows) of follicles at all stages of development were observed, including post ovu-

latory (POF), and atretic follicles (AF). E–H TUNEL-positive reactions in the ovaries were observed in follicular cells (arrows) of CV, VF, POF and AF. I–L In the testis, immunostaining for PCNA was mainly observed in undifferentiated (A_{und}), differentiated (A_{diff}) type A and type B (G_B) spermatogonia, primary spermatocytes (C_1), Sertoli (Sc) and Leydig (Lc) cells. M–P TUNEL-positive reactions in the testis were present in A_{diff} , C_1 , T, Z, Sc and Lc

In another study, exposure to 0.5 to 10 $\mu\text{g/L}$ ACE or ACE combined with other pharmaceutical products in zebrafish for up to 42 days led to an increase in AF and a reduction in egg production, associated with increased mortality in the embryos (Galus et al. 2013a, b), similar to results obtained at 5 and 50 $\mu\text{g/L}$ ACE in this study.

Morphometrical analysis showed larger oocytes in ACE-treated groups, which may be a result of the continued development of VF, indicating a possible failure in the final oocyte maturation (FOM) and ovulation, as also reported in zebrafish exposed to indomethacin, a COX inhibitor NSAID, which reduced the percentage of oocytes showing germinal vesicle breakdown and the spawning rates (Lister and Van Der Kraak 2008). In fish, oocyte maturation and ovulation depend on luteinizing hormone, which results in the synthesis of progestins, such as

17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, regulating the synthesis of PGs and their receptors in somatic cells of mature follicles (Tang et al. 2016; Takahashi et al. 2018). In this sense, Pter4b receptor activation by PGE₂ is closely associated with the induction of actin cytoskeleton rearrangement and rupture of follicular cells during ovulation (Ogiwara and Takahashi 2016), and blocking this receptor may prevent ovulation in zebrafish (Tang et al. 2016). Treatment with ACE at 50 $\mu\text{g/L}$ resulted in higher *ptger2a* and *ptger4b* expression, indicating an attempt to increase the synthesis of receptors to PGs; however, this was not enough to compensate for the reduction in PGE₂ in the ovaries with consequent impact on spawning. In addition, these results also indicated that ACE, mainly at 50 $\mu\text{g/L}$, promotes an increase in *era*, *er β 1*, *er β 2*, and *gper* expression and ovarian E₂ levels, which may also contribute to FOM failure and

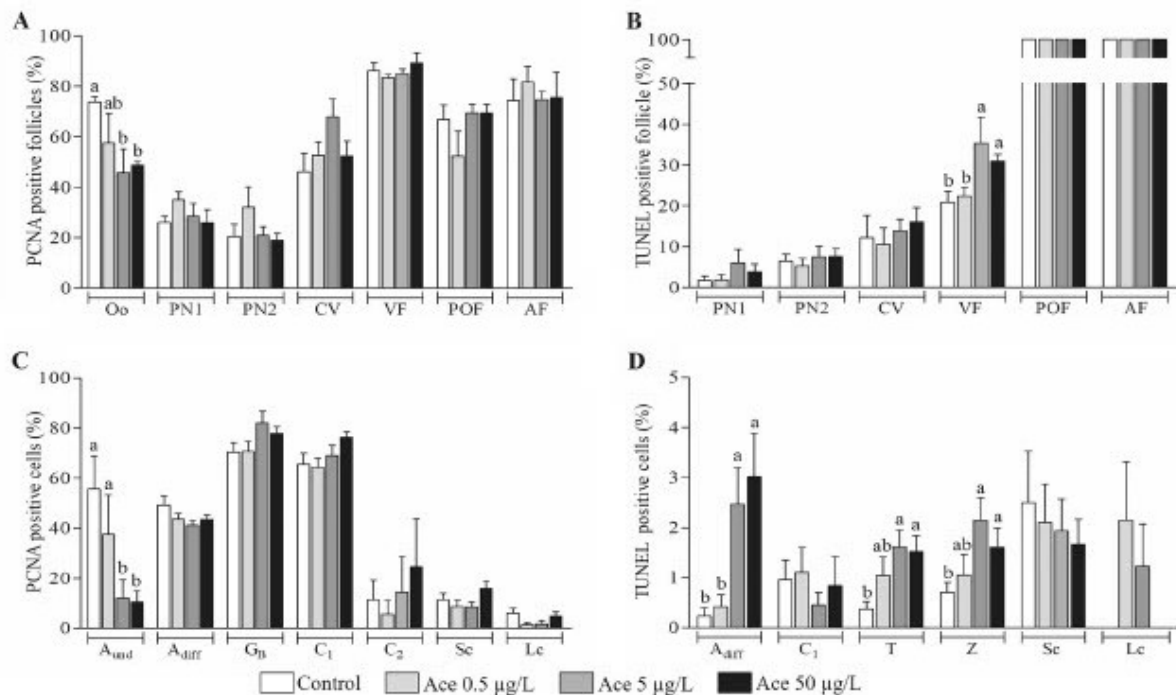


Fig. 3 Morphometric analyses of PCNA and TUNEL-positive reactions in ovaries (A–B) and testis (C–D) in different types of ovarian follicles or testicular cells of zebrafish exposed to different concentrations of acetaminophen for 60 days. Data are the mean \pm SE. Different letters above columns indicate significant differences among treatments ($p < 0.05$, One way Anova). Oogonia (Oo), early (PN1) and

advanced (PN2) perinucleolar follicle, follicle with cortical vesicles (CV), vitellogenic follicle (VF), post-ovulatory follicle (POF), atretic follicle (AF), undifferentiated (A_{und}), differentiated (A_{diff}) type A and type B (G_B) spermatogonia, primary spermatocytes (C_1), Sertoli (Sc) and Leydig (Lc) cells

spawning found in this study. Indeed, a decrease in ER α and ER β levels precedes oocyte ovulation (Liu et al. 2017), thus reinforcing the data of this study. It is possible that failure in FOM with reduction of spawned eggs caused by ACE can be due to lower PGE $_2$ and higher E $_2$ levels associated with the upregulation of estrogens receptors transcripts in the ovaries.

The correct development of gametogenesis and tissue homeostasis in fish depends on the balance between proliferation and cell death (Thomé et al. 2012; Melo et al. 2015; Ribeiro et al. 2017). Regarding PCNA and TUNEL-positive labeling, an interesting relationship was observed in the follicular development of zebrafish in this study. ACE treatment resulted in larger VF associated with increasing TUNEL-positive labeling in follicular cells, with no significant difference in PCNA-stained cells. This increased growth of VF probably due to failure in the FOM leads to an imbalance between proliferation and death of follicular cells, which could trigger follicular atresia and explain the increase of AF in fish exposed to ACE. In contrast, another study with zebrafish exposed to 0.5 and 10 μ g/L ACE for 40 days showed an increase in the TUNEL-positive reaction but without an increase in follicular atresia (Galus et al. 2013b).

The differences between these studies may be related to the longer exposure time and higher concentration of ACE used in this study. Failure in the ovulation and spawning can lead to retention of VF in the ovaries, with lower recruitment of PN1/PN2 and consequently lower proliferation of Oo, as observed in animals treated with ACE in this study.

The effects of NSAIDs, especially ACE, on regulating fish spermatogenesis are poorly understood. This study reported harmful effects of ACE action on spermatogenesis and sperm quality, thus contributing to zebrafish subfertility. Exposure of zebrafish to ibuprofen, an NSAID, caused a reduction in PGE $_2$ levels but did not affect testosterone, E $_2$, and Vtg levels (Morthorst et al. 2013). In contrast, males of *Rhamdia quelen* exposed to 0.25 and 2.5 μ g/L ACE for 21 days showed a reduction in plasma levels of testosterone and an increase in E $_2$ with a consequent reduction in spermatogenic activity (Guiloski et al. 2017). The results indicated that ACE exposure increases testicular E $_2$ levels but reduces those of 11-KT and PGE $_2$ at 5 and 50 μ g/L ACE. Although the testicular expression and activity of steroidogenic enzymes were not evaluated, this study suggested that increased E $_2$ levels after ACE exposure could result from

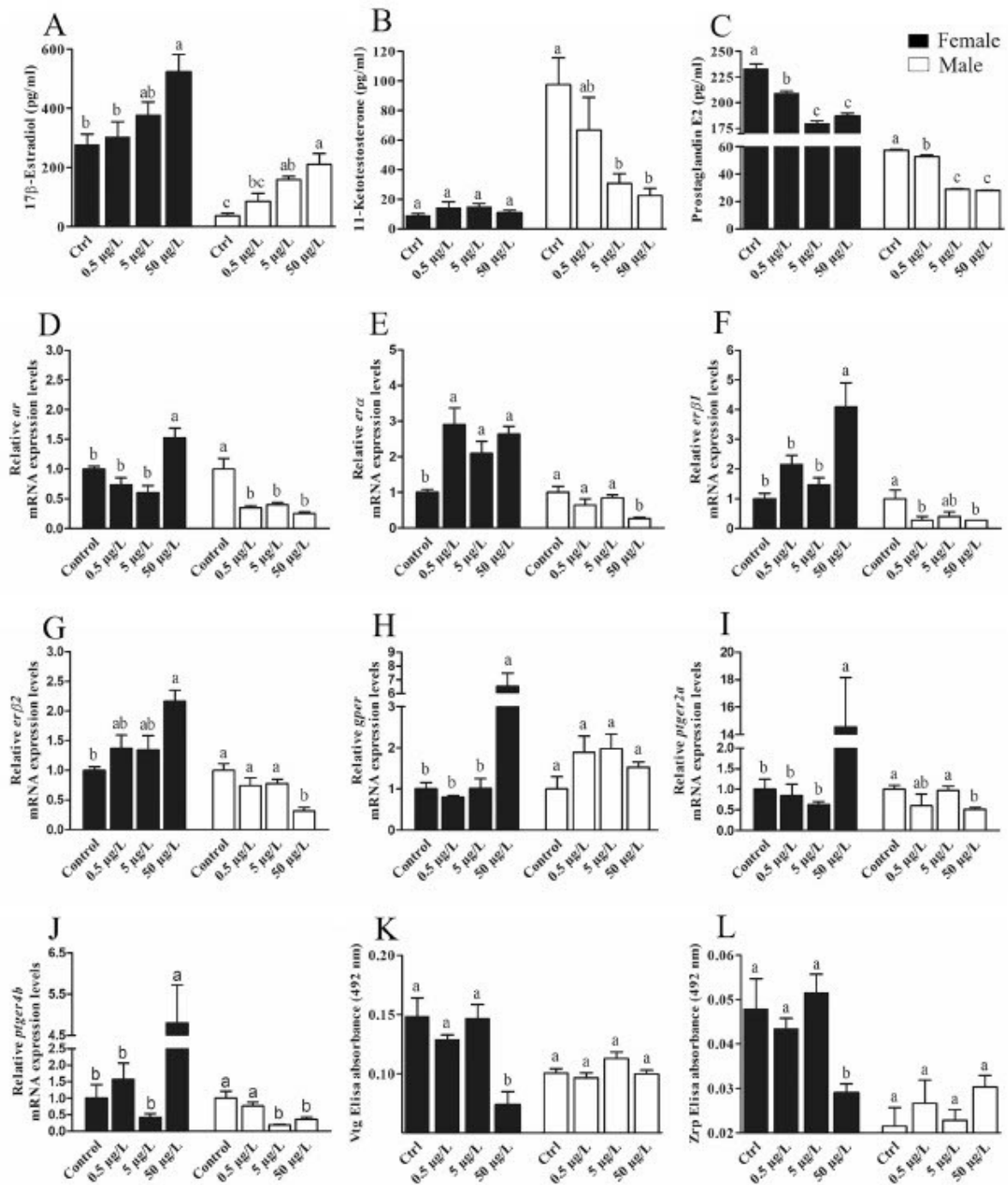


Fig. 4 Gonadal concentration of **A** 17β-Estradiol, **B** 11-Ketotestosterone, **C** Prostaglandin E2, relative mRNA expression of receptors for **D** androgen, **E–G** estrogens and **I–J** prostaglandin E2, hepatic levels of **K** vitellogenin (Vtg), and **L** zona radiata proteins (Zrp) in zebrafish

exposed to acetaminophen for 60 days. Data are the mean ± SE for (**A**, **B**, **C**, **K**, **L**) and mean ± geometric mean for (**D–J**). Different letters above columns indicate significant difference among treatments ($p < 0.05$, One-way Anova or Kruskal–Wallis)

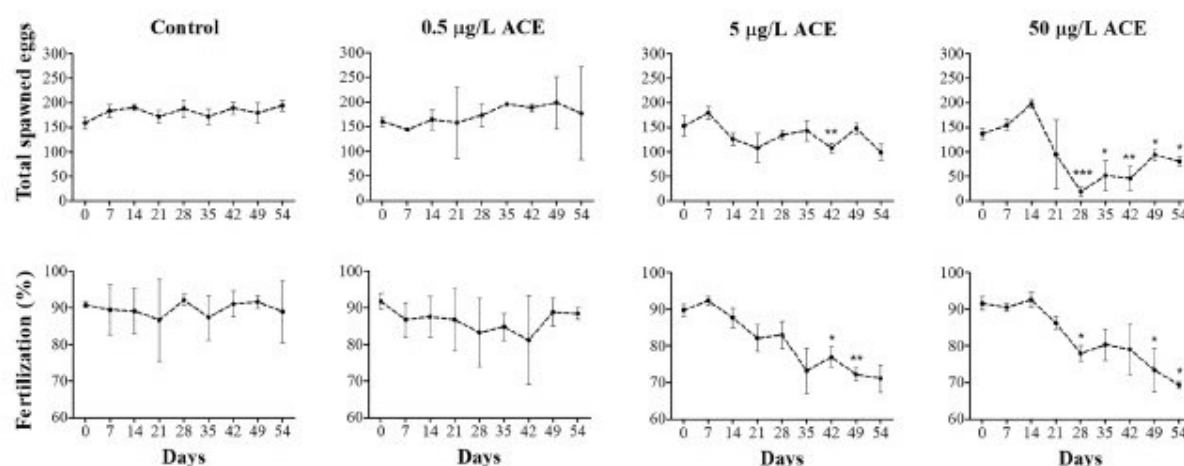


Fig. 5 Total number of spawned eggs and fertilization rate in zebrafish over 60 days of exposure to different concentrations of acetaminophen. Data are the mean \pm S.E and (*) indicate significant difference compared to the control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *t* test)

Table 5 Zebrafish sperm motility parameters at different times after semen activation from fish exposed to different Acetaminophen (ACE) concentrations for 60 days

	Time (s)	Control	0.5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Nonprogressive motility (%)	15	48.28 \pm 1.95 ^b	54.13 \pm 2.63 ^{ab}	45.53 \pm 2.33 ^b	61.71 \pm 1.76 ^a
	30	35.82 \pm 2.40 ^b	44.80 \pm 2.53 ^{ab}	42.41 \pm 2.22 ^b	53.62 \pm 2.33 ^a
	45	40.78 \pm 2.86 ^b	48.02 \pm 3.35 ^{ab}	56.73 \pm 4.96 ^a	57.31 \pm 2.48 ^a
	60	52.47 \pm 3.11 ^b	63.01 \pm 3.53 ^{ab}	65.77 \pm 4.40 ^a	66.23 \pm 3.07 ^a
	180	41.96 \pm 5.01 ^a	47.75 \pm 4.6 ^a	31.05 \pm 5.66 ^{ab}	25.88 \pm 4.44 ^b
Progressive motility (%)	15	41.52 \pm 1.53 ^a	36.62 \pm 1.76 ^{ab}	43.32 \pm 1.92 ^a	33.70 \pm 1.10 ^b
	30	43.95 \pm 2.19 ^a	41.24 \pm 1.47 ^{ab}	45.56 \pm 2.05 ^a	35.87 \pm 1.71 ^b
	45	38.20 \pm 2.95 ^a	33.23 \pm 3.02 ^a	29.57 \pm 4.03 ^a	25.94 \pm 2.41 ^b
	60	19.14 \pm 3.40 ^a	13.67 \pm 1.92 ^a	13.00 \pm 3.70 ^a	11.14 \pm 1.94 ^a
	180	1.96 \pm 0.67 ^a	0.84 \pm 0.32 ^a	0.91 \pm 0.45 ^a	0.46 \pm 0.31 ^a
Straight line velocity (VSL, µm/s)	15	73.32 \pm 2.64 ^a	65.29 \pm 2.00 ^{ab}	70.55 \pm 2.49 ^a	65.02 \pm 1.99 ^b
	30	55.62 \pm 2.25 ^a	50.36 \pm 1.90 ^a	51.62 \pm 1.86 ^a	45.87 \pm 1.72 ^a
	45	43.20 \pm 2.26 ^a	38.06 \pm 1.73 ^{ab}	36.36 \pm 2.43 ^{ab}	33.99 \pm 1.88 ^b
	60	30.18 \pm 2.05 ^a	26.48 \pm 1.26 ^a	23.22 \pm 2.56 ^a	22.86 \pm 1.59 ^a
	180	11.39 \pm 1.64 ^a	8.28 \pm 0.96 ^{ab}	6.40 \pm 1.46 ^b	5.83 \pm 0.96 ^b
Curvilinear velocity (VCL, µm/s)	15	105.92 \pm 3.36 ^a	101.46 \pm 2.83 ^a	100.99 \pm 3.34 ^a	109.30 \pm 3.80 ^a
	30	72.65 \pm 3.08 ^a	70.51 \pm 3.03 ^a	68.79 \pm 2.17 ^a	67.83 \pm 2.19 ^a
	45	54.98 \pm 2.59 ^a	50.85 \pm 2.06 ^a	47.58 \pm 2.94 ^a	48.49 \pm 2.47 ^a
	60	39.89 \pm 2.13 ^a	36.24 \pm 1.35 ^a	32.51 \pm 2.74 ^a	33.99 \pm 1.83 ^a
	180	21.28 \pm 1.27 ^a	18.57 \pm 0.73 ^a	18.80 \pm 1.25 ^a	17.25 \pm 0.89 ^a
Average path velocity (VAP, µm/s)	15	96.48 \pm 3.05 ^a	88.72 \pm 2.30 ^a	91.34 \pm 3.07 ^a	92.49 \pm 3.01 ^a
	30	67.83 \pm 2.19 ^a	63.51 \pm 2.75 ^{ab}	63.20 \pm 2.05 ^{ab}	59.52 \pm 1.92 ^b
	45	48.48 \pm 2.40 ^a	45.80 \pm 1.98 ^a	43.30 \pm 2.79 ^a	42.77 \pm 2.28 ^a
	60	33.99 \pm 1.83 ^a	31.78 \pm 1.37 ^a	28.20 \pm 2.80 ^a	29.24 \pm 1.77 ^a
	180	17.25 \pm 0.89 ^a	11.52 \pm 1.02 ^a	9.67 \pm 1.60 ^a	9.33 \pm 1.06 ^a

Values represents mean \pm standard error. In each line, different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$)

an enhanced conversion of testosterone in E_2 via aromatase (Cyp19a1a), thus decreasing the availability of this androgen as a substrate to 11-KT production.

Recently, it was reported that PGE_2 increases the proliferation and self-renewal of A_{und} , resulting in its accumulation, being this role dependent on the action of androgens, such as 11-KT (Morais et al. 2017; Crespo et al. 2020). In addition to other functions, E_2 also regulates spermatogonia self-renewal, and 11-KT is important in promoting spermatogonia proliferation and differentiation (Schulz et al. 2010). In agreement, a reduction in the proportion of A_{und} due to lower proliferative activity (PCNA reaction) and the transcripts of *ar*, *era*, *erf1*, *erf2*, *ptger2a*, and *ptger4b* were observed at ACE 50 $\mu\text{g/L}$ in this study. Downregulation of estrogens, androgens, and PGE_2 receptors elicited by ACE may implicate low signal transduction for hormones, making testicular cells less responsive to the action of E_2 , 11-KT, and PGE_2 . Regarding A_{diff} , ACE 50 $\mu\text{g/L}$ promoted an increased amount of these cells without an increase in proliferation, resulting in accumulation and lower differentiation of these cells to G_B . The results also pointed to an increase in apoptosis of A_{diff} , probably related to the supporting capacity of Sc. Taken together, ACE exposure can impair self-renewal and differentiation of A_{und} and cause an imbalance in germ cell numbers.

Besides the spermatogonial phase, spermiogenesis was also affected at 5 and 50 $\mu\text{g/L}$ ACE treatments, whereas only a few changes were found in the meiotic phase, as also found in fish exposed to estrogenic compounds (Weber et al. 2019). The effects of 11-KT and *ar* expression have been associated with spermiogenesis and a higher Z production (Schulz et al. 2010; Crowder et al. 2018; Zheng et al. 2020). This study also showed that ACE increased T and Z apoptosis (TUNEL reaction). Similar results were reported in *Astyanax bimaculatus* exposed to estrogenic compounds (bisphenol A and estrone) but without Z apoptosis (Paschoalini et al. 2021). Thus, increased T and Z apoptosis, followed by low Z numbers, indicated that the negative effects of ACE in the final stages of spermiogenesis contribute to the subfertility of zebrafish.

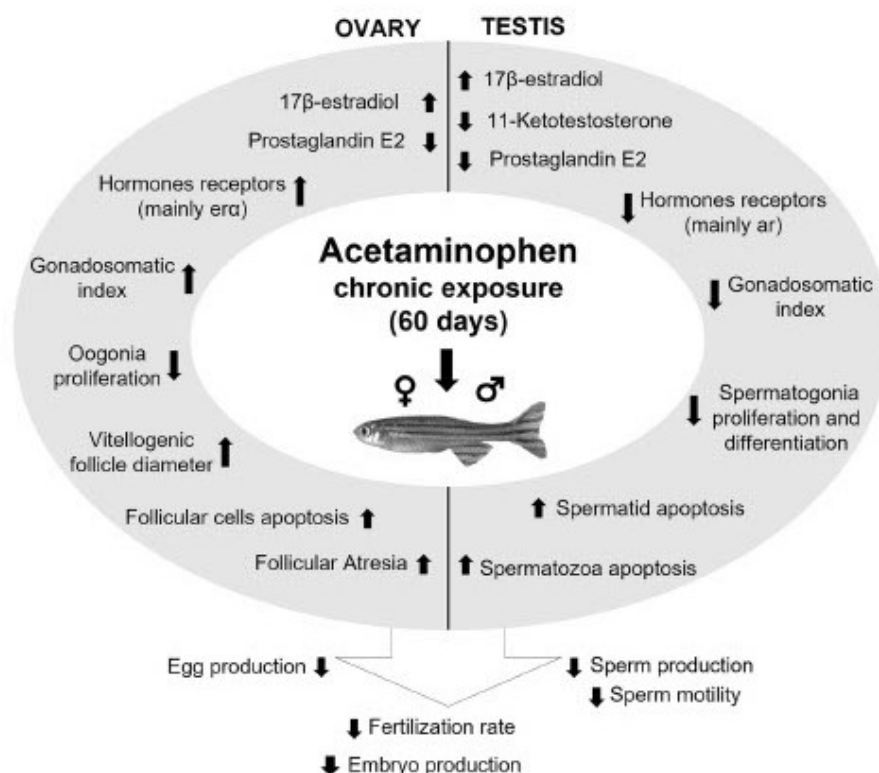
Along with Z apoptosis, these results also showed changes in the key parameters of sperm quality: progressive and nonprogressive motility, VSL, and trajectory velocity. In mammals, several studies have linked NSAIDs, such as aspirin and ACE, to low sperm quality due to the presence of morphological alterations and apoptosis of

Z, decreased nitric oxide levels, and increased oxidative stress inductors in the semen (Aksu et al. 2016; Banihani 2017, 2019; Banihani and Shatnawi 2020). Indeed, PGs play a role in semen quality, stimulating sperm motility (Gottlieb et al. 1988), and human sperm treated with PGE_2 have increased progressive motility (Rios et al. 2016). In contrast, zebrafish knockout for the *ar* gene showed a decreased sperm production and reduced ability to fertilize oocytes (Crowder et al. 2018), although normal motility and fertilization ability were reported in *Oreochromis niloticus* without 11-KT (Zheng et al. 2020). Taken together, these data indicated that the reduction in sperm quality induced by ACE treatment might be an effect of low testicular levels of PGE_2 combined with the reduction of transcripts of *ar*, *ptger2a*, and *ptger4b* in zebrafish testes.

In addition to the low sperm quality observed in the groups treated with ACE, the results of this study suggested that treatment reduced the reproductive potential and egg quality of zebrafish given by the reduction in egg production and viable embryos in 5 and 50 $\mu\text{g/L}$ ACE groups. Moreover, the increase in the proportion of AF is evidence that ACE has affected oogenesis, as follicular atresia can be induced not only by ovulation failure but also by errors incompatible with adequate development of ovarian follicles (Lubzens et al. 2010). Despite no significant increase in Vtg and Zrp production in males in this study, the increase in E_2 levels associated with the reduction on 11-KT suggests that ACE acts as an estrogenic EDC and weakens fish reproduction.

In summary, comparing zebrafish females and males (Fig. 6), chronic exposure to ACE reduced PGE_2 and increased E_2 production, with upregulation of the transcripts of their receptors in ovaries, affecting the final stages of vitellogenesis, inducing follicular atresia, and failure in FOM. In males, ACE affected the proliferation and differentiation of spermatogenic cells, possibly caused by reduced PGE_2 and 11-KT, and increased E_2 , with downregulation of the transcripts of their receptors. Together, these facts culminated in the reduction of spawning, semen production and motility, and embryo viability. Therefore, our study demonstrates that ACE impairs zebrafish reproductive performance by affecting multiple parameters of gametogenesis and gamete quality, these factors being sex-dependent.

Fig. 6 A schematic overview of the main effects of acetaminophen on zebrafish gonads after 60 days exposure. Changes in hormones and their respective receptors impair the germ cells development that culminate in reduction of the reproductive capacity in zebrafish



Acknowledgements This study was supported by the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 310283/2020-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, financial code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The authors would like to thank Adriana Raabe and the Proteomics Laboratory (ICB/UFMG) for their support in carrying out the water analyses, and Professor Gustavo Batista de Menezes and the team at the Center for Gastrointestinal Biology (ICB /UFMG) for their support in qPCR analyses.

Author contributions The authors declare their consent to have their names included in this study. DPM: conceptualization, methodology, data curation, formal analysis, writing, review, editing, YMR, CSF, SMSNL: methodology, data curation, review; ER: conceptualization, supervision, funding acquisition, writing, review, and editing. All authors performed data interpretation.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aksu EH, Özkaraca M, Kandemir FM et al (2016) Mitigation of paracetamol-induced reproductive damage by chrysin in male rats via reducing oxidative stress. *Andrologia* 48:1145–1154. <https://doi.org/10.1111/and.12553>
- Ayobahan SU, Eilebrecht S, Baumann L et al (2020) Detection of biomarkers to differentiate endocrine disruption from hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) using proteomics. *Chemosphere* 240:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124970>
- Baker SJC, Corrigan E, Melnyk N et al (2021) Nuclear progesterone receptor regulates ptger4b and PLA2G4A expression in zebrafish (*Danio rerio*) ovulation. *Gen Comp Endocrinol* 311:113842. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113842>
- Banihani SA (2017) Effect of paracetamol on semen quality. *Andrologia* 1:1–4. <https://doi.org/10.1111/and.12874>
- Banihani SA (2019) Effect of aspirin on semen quality: a review. *Andrologia* 52:3–8. <https://doi.org/10.1111/and.13487>
- Banihani SA, Shatnawi RM (2020) Aspirin decreases human sperm motility and vitality, chelates seminal calcium, but insignificantly reduces seminal nitric oxide production. *Andrologia* 52:1–8. <https://doi.org/10.1111/and.13776>
- Baumann L, Holbech H, Schmidt-Posthaus H et al (2020) Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (*Danio rerio*)? *Chemosphere* 238:124589. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124589>
- Bertotto LB, Richards J, Gan J et al (2018) Effects of bifenthrin exposure on the estrogenic and dopaminergic pathways in zebrafish embryos and juveniles. *Environ Toxicol Chem* 37:236–246. <https://doi.org/10.1002/etc.3951>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Campanha MB, Awan AT, Mozeto AA, Fadini PS (2015) A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream

- of São Paulo State of Southeast Brazil. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3929-x>
- Crespo D, Lemos MS, Zhang YT et al (2020) PGE2 inhibits spermatogonia differentiation in zebrafish: interaction with Fsh and an androgen. *J Endocrinol* 244:163–175. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0309>
- Crowder CM, Lassiter CS, Gorelick DA (2018) Nuclear androgen receptor regulates testes organization and oocyte maturation in zebrafish. *Endocrinology* 159:980–993. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00617>
- Dean A, Van Den DS, Wang Y et al (2016) Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep19789>
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E (2012) Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manag* 104:19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.021>
- Galus M, Jeyaranjan J, Smith E et al (2013a) Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquat Toxicol* 132–133:212–222. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.016>
- Galus M, Kirischian N, Higgins S et al (2013b) Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat Toxicol* 132–133:200–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>
- Gómez MJ, Martínez Bueno MJ, Lacorte S et al (2007) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66:993–1002. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.051>
- González-Rojo S, Lombó M, Fernández-Díez C, Herráez MP (2019) Male exposure to bisphenol A impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environ Pollut* 248:368–379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.127>
- Gottlieb C, Svanborg K, Eneroth P, Bygdeman M (1988) Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphate content. *Fertil Steril* 49:322–327. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59723-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59723-4)
- Guiloski I, Ribas J, Piancini L et al (2017) Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environ Toxicol Pharmacol* 53:111–120
- Lau SM, McGuire TM, Van Driel ML (2016) Consumer concerns about paracetamol: a retrospective analysis of a medicines call centre. *BMJ Open* 6:1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010860>
- Legrand A, Albert O, Lesne L et al (2013) Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Hum Reprod* 28:1890–1898. <https://doi.org/10.1093/humrep/det112>
- Lister AL, Van Der Kraak G (2008) An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *Gen Comp Endocrinol* 159:46–57. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.07.017>
- Liu W, Xin Q, Wang X et al (2017) Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell Death Dis* 8:1–11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.82>
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J (2010) Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165:367–389. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
- Melo RMC, Martins YS, Luz RK et al (2015) PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Tissue Cell* 47:541–549. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.10.002>
- Morais RDVS, Crespo D, Nóbrega RH et al (2017) Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. *Mol Cell Endocrinol* 454:112–124. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.017>
- Morthorst JE, Lister A, Bjerregaard P, Der Van Kraak G (2013) Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comp Biochem Physiol* C Toxicol Pharmacol 157:251–257. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.12.001>
- Nelson ER, Habibi HR (2013) Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 192:15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032>
- Ogiwara K, Takahashi T (2016) A dual role for melatonin in medaka ovulation: ensuring prostaglandin synthesis and actin cytoskeleton rearrangement in follicular cells. *Biol Reprod* 94:1–15. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133827>
- Paschoalini AL, Savassi LA, Weber AA et al (2021) Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiol Biochem* 47:797–810. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00938-5>
- Poleo GA, Denniston RS, Reggio BC et al (2001) Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 65:961–966. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.961>
- Pzybyla GW, Szychowski KA, Gmiński J (2021) Paracetamol—an old drug with new mechanisms of action. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 48:3–19. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13392>
- Qie Y, Qin W, Zhao K et al (2021) Environmental estrogens and their biological effects through GPER mediated signal pathways. *Environ Pollut* 278:116826. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116826>
- Ribeiro YM, de Matos SA, Domingos FFT et al (2017) Germ cell proliferation and apoptosis during testicular regression in a seasonal breeding fish kept in captivity. *Tissue Cell* 49:664–671. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.09.003>
- Riesco MF, Robles V (2013) Cryopreservation causes genetic and epigenetic changes in zebrafish gonadal ridges. *PLoS ONE* 8:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067614>
- Rios M, Carreño DV, Osés C et al (2016) Low physiological levels of prostaglandins E2 and F2 α improve human sperm functions. *Reprod Fertil Dev* 28:434–439. <https://doi.org/10.1071/RD14035>
- Schulz RW, de França LR, Laeyre JJ et al (2010) Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- Takahashi T, Hagiwara A, Ogiwara K (2018) Prostaglandins in teleost ovulation: a review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 461:236–247. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.019>
- Tang H, Liu Y, Li J et al (2016) Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Sci Rep* 6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep28545>
- Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M et al (2019) The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends Biotechnol* 37:761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Thomé RG, Domingos FFT, Santos HB et al (2012) Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* 44:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.11.002>
- Vliegenthart ADB, Tucker CS, Del PJ, Dear JW (2014) Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *Br J Clin Pharmacol* 78:1217–1227. <https://doi.org/10.1111/bcp.12408>
- Weber AA, Moreira DP, Melo RMC et al (2017) Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci Total Environ* 592:693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.181>
- Weber AA, Moreira DP, Melo RMC et al (2019) Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *Gen Comp Endocrinol* 279:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.016>
- Zheng Q, Xiao H, Shi H et al (2020) Loss of Cyp11c1 causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *J Endocrinol* 244:487–499. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0438>

Żur J, Piński A, Marchlewicz A et al (2018) Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environ Sci Pollut Res* 25:21498–21524. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2517-x>

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo 2: Exposição crônica ao acetaminofeno provoca hipometilação global do DNA gonadal e prejudica a reprodução da prole do zebrafish *Danio rerio*

Artigo em construção – a ser submetido na revista Reproductive Toxicology.

Exposição crônica ao acetaminofeno provoca hipometilação global do DNA gonadal e prejudica a reprodução da prole do zebrafish *Danio rerio*

Resumo

O acetaminofeno (ACE) é um dos anti-inflamatórios não esteroides mais comercializados no mundo. Ele é frequentemente encontrado nos ambientes aquáticos onde pode prejudicar a reprodução de organismos e está associado a modificações epigenéticas. O objetivo desse estudo foi investigar se a exposição crônica de uma geração parental (F0) ao ACE (0,5; 5 e 50 µg/L) é capaz de provocar alterações na gametogênese e reprodução da prole (F1 e F2) do zebrafish, bem como investigar alterações no padrão de metilação global do DNA nas gônadas dos progenitores. Na F0 foram quantificados glutathione (GSH) e DNA metilado. Na F1 e F2 foram avaliadas o desenvolvimento das células germinativas, concentrações de 17β-estradiol (E₂), 11-Ketotestosterona (11-KT), além das taxas de desova, fertilização e qualidade espermática. Os resultados mostraram redução da GSH e da expressão de enzimas que metilam o DNA (DNMTs), aumento das enzimas que desmetilam o DNA (TETs) e hipometilação global do DNA nos testículos e ovários da F0. Os ovários da F1 e F2, originados da geração F0 que foi exposta principalmente a 50 µg/L de ACE, apresentaram menor concentração de E₂ e folículos vitelogênicos em menor quantidade, o que pode estar relacionado a uma menor quantidade de ovos liberados observada. Já os testículos da F1 de progenitores também expostos à 50 µg/L, apresentaram menor concentração de 11-KT, espermatozoides menos abundantes e menor qualidade do sêmen. Os machos F2 não apresentaram alterações reprodutivas com o tratamento da F0 ao ACE. Em conjunto, este estudo demonstrou que a exposição crônica ao ACE é capaz de induzir alterações epigenéticas na geração parental e reduzir a capacidade reprodutiva da prole (F1 e F2) do zebrafish, com fêmeas sendo mais sensíveis do que machos a essas alterações epigenéticas. Portanto, avaliações transgeracionais são elementos-chave para determinar a magnitude dos efeitos adversos da contínua exposição de poluentes emergentes nas populações dos organismos aquáticos.

Palavras-chave: Acetaminofeno, zebrafish, reprodução, metilação do DNA, transgeracional.

Introdução

O acetaminofeno (ACE), comercialmente conhecido como paracetamol, é um dos anti-inflamatórios não-esteróides (AINE) mais consumido no mundo, e exerce seu efeito terapêutico ao inibir a produção de prostaglandinas pelas enzimas ciclooxigenases (LAU; MCGUIRE; VAN DRIEL, 2016; PRZYBYŁA; SZYCHOWSKI; GMIŃSKI, 2021). O ACE foi encontrado em efluentes urbanos de países sul-americanos, asiáticos e europeus em concentrações variando de 0,1 a 246 µg/L (CAMPANHA *et al.*, 2015; CAPPARELLI *et al.*, 2021; GÓMEZ *et al.*, 2007; ŻUR *et al.*, 2018) e a sua presença representa um risco ambiental, pois pode agir em espécies não-alvos, e atuar como uma substância desreguladora endócrina (EDC).

Os EDCs são substâncias capazes de interagir com o sistema endócrino de vertebrados e interferir na síntese, secreção e sinalização de hormônios endógenos, e pode prejudicar processos importantes como a reprodução (FLINT *et al.*, 2012). O ACE e outros AINES foram relacionados a alterações na gametogênese, qualidade espermática, desova, produção de embriões, eclosão, sobrevivência de larvas e produção de esteróides sexuais de peixes em condições experimentais (GALUS; KIRISCHIAN; *et al.*, 2013b; GUILOSKI *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2022), o que demonstra seu potencial risco para populações nativas. Nos peixes, a gametogênese e desenvolvimento gonadal são regulados principalmente por esteróides sexuais, como o 17β-estradiol (E₂) e a 11-ketotestosterona (11-KT) que estimulam a proliferação e diferenciação das células germinativas (LUBZENS *et al.*, 2010; SCHULZ *et al.*, 2010).

No zebrafish, assim como em outros vertebrados, o fígado é o principal local de metabolização do ACE, que inicia a degradação da droga por hidroxilação realizada pela enzima CYP3A65, produzindo ao menos dois compostos nocivos à saúde dos animais: a 1,4-benzoquinone e a N-acetyl-p-benzoquinona imina (NAPQI) (VLIEGENTHART *et al.*, 2014). Em uma segunda fase de metabolização do ACE, a glutathione (GSH), presente em diversos órgãos, é responsável pela neutralização dos compostos gerados após a primeira fase de metabolização (VLIEGENTHART *et al.*, 2014). O padrão de metilação do DNA pode ser alterado por causa da depleção de GSH quando esta é conjugada cronicamente a substâncias químicas e seus metabólitos (LEE; JR; PORTA, 2009), tal como ocorre com o ACE. Isso acontece porque a metilação do DNA é dependente de S-Adenosylmethionine (SAM), uma molécula chave na doação do grupo metil para as metiltransferases metilarem o DNA e sua

síntese é suprimida quando a concentração de GSH diminui. A produção de GSH e SAM é dependente de metionina e hemocisteína, mas a redução dos níveis de GSH desloca a produção de metionina e hemocisteína para a produção de mais GSH, conseqüentemente levando a uma redução na concentração de SAM e comprometendo a metilação do DNA (LEE; JR; PORTA, 2009). Em zebrafish, o sistema de metilação do DNA é similar ao de mamíferos, sendo catalisado principalmente pelas DNA metiltransferases (Dnmt1, Dnmt3 a Dnmt8) e enzimas que desmetilam o DNA, as ten-eleven translocation (Tet1, Tet2 e Tet3) (GOLL; HALPERN, 2015).

Há uma significativa quantidade de estudos em diversos grupos animais, que demonstram efeitos de EDCs transmitidos, por alterações epigenéticas como o padrão de metilação do DNA, para a geração seguinte que podem persistir por várias gerações (ROBAIRE *et al.*, 2022). Efeitos multi e transgeracionais como alterações na gametogênese, redução da fertilidade, e desenvolvimento de embriões foram observados duas gerações após a exposição de zebrafish ao bisfenol A (BPA) (AKHTER *et al.*, 2018). Alguns trabalhos tem relacionado o consumo de ACE durante a gestação com alterações epigenéticas e comportamentais em crianças (GERVIN *et al.*, 2017), e com a fertilidade de ratos (DEAN *et al.*, 2016). Muitos trabalhos têm focado nos efeitos do ACE e outros AINES na geração parental, mas a sua relação com efeitos reprodutivos transgeracionais em peixes ainda não é conhecida. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi investigar se a exposição crônica ao ACE promove alterações no padrão de metilação global do DNA das gônadas dos progenitores e gera alterações na gametogênese e reprodução das gerações F1 e F2 de zebrafish.

Materiais e métodos

Os procedimentos com animais realizados neste estudo seguiram princípios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo n° 115/2020).

Exposição ao acetaminofeno

Espécimes de zebrafish *D. rerio* com 120 dias de idade foram adquiridos de um comerciante local (EcoFish Aquários e Lagos Ltda) e mantidos em aquários de 20L (15 fêmeas e 15 machos) a uma temperatura de 26-28°C com fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro para aclimatação. Após 30 dias os animais foram submetidos em triplicatas à 0µg/L (controle), 0,5

$\mu\text{g/L}$, $5 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ de ACE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 60 dias (geração parental F0). Posteriormente à fase de exposição os animais de cada tanque foram transferidos para tanques com água sem a presença de ACE e mantidos por 24h nessa condição para garantir que ovos e espermatozoides não tivessem contato com o fármaco. Ao fim desse período, uma caixa coletadora de ovos que cobre ~40% do fundo de cada aquário foi mantida overnight para se obter desovas. Na manhã seguinte, a caixa foi removida e 150 embriões (geração F1) foram coletados e mantidos em aquários de 20 L com sistema de aeração e recirculação de água até o final do experimento. Fragmentos de gônadas ($n = 6/\text{sexo}/\text{grupo}$) da geração parental foram obtidos e submetidos à RTq-PCR para quantificar a expressão gênica de *dnmt1*, *dnmt3*, *dnmt5*, *dnmt8*, *tet1*, *tet2* e *tet3*. As condições experimentais, parâmetros físico-químicos, e concentrações reais de ACE na água foram previamente reportados por Moreira *et al.* (2022).

Condições de manutenção da F1 e F2

Durante os primeiros 45 dias de crescimento da F1 os animais foram alimentados exclusivamente com artêmias vivas (4× ao dia) e após esse período foram alimentados *ad libitum* com ração comercial (Tetramin Tropical Flakes; Tetra, USA; 4× ao dia) e artêmeias vivas (1× ao dia). Os aquários foram monitorados diariamente, para manutenção da qualidade da água e eliminação dos animais que não sobreviveram, até atingirem a fase adulta (100 dias pós-desova) Ao atingirem 100 dias, foram selecionados aleatoriamente 15 fêmeas e 15 machos por aquário para continuar o experimento. A partir desse período a desova foi monitorada uma vez por semana usando uma caixa coletadora de ovos que cobre ~40% do fundo de cada aquário. Após 150 dias e garantida a atividade reprodutiva dos peixes, foi iniciado o período de mensuração da desova e taxa de fertilização por 60 dias. Ao final desse período, 150 embriões (geração F2) foram coletados e mantidos em aquários de 20 L para prosseguimento do experimento, enquanto os adultos (F1) foram anestesiados com eugenol e eutanasiados por secção transversal da coluna cervical. Comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso das gônadas (PG) foram obtidos, e o índice gonadossomático ($\text{IGS} = \text{PG}/\text{PC} \times 100$) foi calculado. As gônadas foram coletadas para análises histológicas e moleculares. Testículos de 6 espécimes ($n = 2$ por aquário) de cada grupo foram coletados para imediata análise de sêmen.

Os procedimentos e condições experimentais envolvidos com os animais da F2 seguiram o mesmo padrão descrito acima para F1. Durante todo o experimento, ~70% da água dos aquários foi renovada a cada 2 dias e os parâmetros físico-químicos da água dos aquários

da F1 e F2 foram considerados normais sem diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1).

Histologia e morfometria

Para análise da gametogênese nas gerações F1 e F2, gônadas ($n = 6/\text{sexo}/\text{grupo}$) foram fixadas em líquido de Bouin por 12 h e mantidos em álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram gradualmente desidratadas em álcool, incluídas em parafina, cortadas a 5 μm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. As análises morfométricas foram conduzidas em secções histológicas de seis peixes por grupo de acordo com Weber et al. (2017, 2019).

Para quantificar a proporção (%) de folículos ovarianos, cinco campos de diferentes seções histológicas com 250 μm de distância cada ($n = 30$ campos/tratamento) foram escolhidos aleatoriamente e fotografados com ampliação de 100 \times usando uma ferramenta de análise de imagem (software Carl Zeiss AxioVision SE64) acoplada a um microscópio óptico. As imagens foram analisadas usando ImageJ 1.4.9 (National Institutes of Health) sobrepondo uma grade com 540 pontos equidistantes sobre cada imagem. Nas fêmeas, os pontos incidentes nas ovogônias (Oo), folículos perinucleolares (PN), folículos com vesículas corticais (CV), folículos vitelogênicos (VF), folículos pós-ovulatórios (FPO), folículos atrésicos (AF), e tecido conjuntivo foram quantificados.

Nos machos, a quantificação dos componentes testiculares foi realizada em cortes histológicos com aumento de 400 \times . As proporções de (%) de espermatogônia tipo A indiferenciadas (Aund) e diferenciadas (Adiff), espermatogônia tipo B (GB), espermátocitos primários (C1) e secundário (C2), espermátides (T), espermatozoides (Z), túbulo seminífero (ST) lúmen, células de Sertoli (Sc), células de Leydig (Lc) e tecido intersticial foram quantificadas.

Esteroides sexuais e GSH

Para avaliar as concentrações de E_2 , 11-KT e GSH da F1 e F2, amostras de gônadas ($n = 6/\text{sexo}/\text{grupo}$) foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas a um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). As amostras foram homogeneizadas em um tampão de extração [50 mM Tris-HCl (pH 8,0) com 0,002% de aprotinina e 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto] em uma proporção de tecido/tampão de 1:2. Os extratos foram agitados em vortex e centrifugados a 15.000 \times g por 60 min a 4 $^{\circ}\text{C}$, e o sobrenadante foi coletado para análise. As concentrações gonadais de E_2 , 11-KT e GSH foram determinadas por ELISA de acordo com as diretrizes do fabricante (Cayman Chemical ELISA kit E_2

#582251, 11-KT #582751 e GSH #703002). O limite de detecção dos ensaios foi de 6,6 pg/mL (E₂), 0,8 pg/mL (11-KT) e 0,05 µM (GSH).

Extração de RNA e real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Para quantificar a expressão gênica das DNA-metiltransferases (*dnmt1*, *dnmt3*, *dnmt5* e *dnmt8*) e das ten-eleven translocation (*tet1*, *tet2* e *tet3*), o RNA de seis gônadas por sexo de cada tratamento da F0 foi isolado usando TRIzol (Sigma-Aldrich) de acordo com orientações do fabricante. O RNA total foi quantificado usando um Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e 60 ng de RNA foram reversamente transcritos para cDNA usando o kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA resultante foi submetido a qRT-PCR usando o iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) em um termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), e os ciclos de reação seguiram as recomendações do fabricante. Os primers usados para qRT-PCR estão listados na Tabela 2. Os níveis relativos de expressão gênica foram determinados pela normalização para 18S rRNA e *actb2* usando o método $\Delta\Delta CT$, e os resultados são apresentados como um aumento de vezes em relação ao grupo controle (TAYLOR *et al.*, 2019).

DNA metilado

Para medir o total global de DNA metilado, amostras de gônadas (n = 6/sexo/grupo) da F0 foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas a extração de DNA. O DNA total das gônadas foi extraído e purificado utilizando o Kit de Extração de DNA Mini Spin (Kasvi #K9-0050) de acordo com as recomendações do fabricante. Um total de 100 ng de DNA purificado foi utilizado para quantificação do DNA metilado total utilizando o Imprint™ Methylated DNA Quantification Kit (Sigma Aldrich #MDQ1-96RXN) de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em percentual (%) de DNA metilado.

Desova e fertilização

A desova da F1 e F2 foi obtida uma vez por semana conforme já descrito e os ovos viáveis e não-viáveis foram contados de 4 – 6h após desova. Com o auxílio de um estereomicroscópio, embriões translúcidos em fase de blastocisto bem desenvolvido foram contados como fertilizados, enquanto ovos opacos com material coagulado foram considerados inviáveis (POLEO *et al.*, 2001). O número de ovos desovados e as taxas de

fertilização (%) foram calculados a cada 7 dias de 150 a 172 dias para cada grupo, em triplicata.

Qualidade do sêmen

Para analisar a qualidade dos espermatozoides, amostras de sêmen de seis peixes por tratamento foram obtidas após massagem suave dos testículos em solução balanceada de Hank na concentração de 1:50 peso/volume. Após 10 min, as amostras foram ativadas com água destilada e analisadas com o auxílio de uma câmara de Makler e um microscópio contraste de fase equipado com uma placa aquecida a 28 °C acoplada a um sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) modelo Sperm Class Analyzer versão 4.0 (Analysis Laboratory; Microptic SL, Barcelona, Espanha). Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade progressiva e não progressiva, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de percurso (VAP) e velocidade linear (VSL) com 15, 30, 45, 60 e 180 s após a ativação.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism 5. O teste de Lilliefors foi usado para verificar a normalidade dos dados. O teste *t* foi utilizado para comparar as taxas de desova e fertilização entre os grupos tratados e o controle. One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn (para dados não paramétricos) foram usados para analisar a qualidade da água, parâmetros de qualidade do sêmen, dados morfométricos da gametogênese, ELISA e expressão gênica. Os dados foram expressos como média geométrica ± erro padrão (SE) nos resultados de qRT-PCR e média ± SE para todos os outros resultados, e as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Resultados

Análises histológicas e proporção de células germinativas

Para avaliar o efeito da exposição ao ACE na gametogênese e reprodução da prole do zebrafish (gerações F1 e F2), o IGS e a proporção das células germinativas foram quantificados. Análises histológicas mostram ovários e testículos em maturação em todos os exemplares examinados, folículos e células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento. Em fêmeas F1, a exposição parental à 50 µg/L de ACE resultou em aumento

do CT e PC com redução do IGS quando comparado ao grupo controle (Tabela 3). As análises histológicas revelaram aumento na proporção de PN, diminuição de VF e POF. Semelhante ao observado na F1, fêmeas F2 de progenitores tratados com 50 µg/L de ACE, apresentaram redução no IGS, na proporção de VF e POF, e aumento de PN. Não foi observado diferenças na proporção de Oo, CV, AF e tecido intersticial na F1 e F2.

Em machos F1, houve significativo aumento do CT e proporção de C1 com diminuição na quantidade de Z em peixes do grupo de 50 µg/L de ACE (Tabela 3). O tratamento não resultou em alterações de PC, IGS e demais componentes testiculares analisados na F1. Nos machos F2, todos os parâmetros biométricos e histológicos não foram alterados pelo tratamento da F0 com ACE.

Esteroides sexuais

As concentrações gonadais dos dois principais esteroides sexuais foi quantificada para se analisar a fisiologia gonadal. Os resultados revelaram que a exposição parental ao ACE altera as concentrações de E₂ e 11-KT na F1 (Figura 1 a-b), mas não é capaz de alterar esses hormônios na F2 do zebrafish (Figura 1 c-d). Nas fêmeas F1, a concentração de E₂ foi menor no grupo em que os progenitores foram expostos à 50 µg/L de ACE, ao passo que machos não apresentaram diferenças na concentração desse hormônio quando comparados ao grupo controle. A concentração de 11-KT foi menor no grupo 50 µg/L de ACE para machos, enquanto fêmeas não apresentaram diferenças significativas desse andrógenos.

Desova e produção de embriões

Para avaliar se a exposição parental ao ACE afeta a produção de ovos e a fertilização dos ovos na prole do zebrafish, a desova foi monitorada semanalmente em peixes com 150 dias pós fertilização. Os resultados mostraram que a exposição parental à 50 µg/L de ACE reduziu o total de ovos desovados na F1 e F2 com diferenças significativas em peixes com até 185 dias (Figura 2 a-b). A taxa de fertilização dos ovos da F1 foi reduzida durante todo o período analisado, novamente, apenas em peixes onde os progenitores foram expostos à 50 µg/L de ACE. Não houve diferenças significativas nas taxas de fertilização dos ovos na F2 entre os tratamentos.

Qualidade do sêmen

Para avaliar se a qualidade espermática poderia afetar a taxa de fertilização dos ovos de zebrafish cuja geração parental foi exposta ao ACE, parâmetros chave como motilidade e velocidade dos Z foram avaliados. Os resultados revelaram redução na quantidade de Z com motilidade progressiva e não progressiva a partir de 60 s na F1 cujos progenitores foram expostos à 5 µg/L e 50 µg/L de ACE (Tabela 4). Nesses mesmos grupos, ocorreu redução da VSL, VCL e VAP também a partir de 60 s. Esses resultados demonstram que a exposição ao ACE em uma geração parental é capaz de induzir prole com quantidade reduzida de espermatozoides capazes de se deslocarem em uma trajetória retilínea, além de reduzir a velocidade com que eles percorrem esse trajeto. Uma vez que não foi encontrada diferenças nas taxas de fertilização e proporção de células germinativas testiculares, a análise de qualidade espermática não foi conduzida nos peixes da F2.

GSH e metilação do DNA

Para relacionar o ACE a possíveis alterações epigenéticas, concentrações de GSH, proporção de DNA metilado total e expressão de genes relacionados à metilação do DNA foram mensurados em peixes da geração F0. O tratamento com 5 µg/L e 50 µg/L de ACE levou a diminuição na concentração de GSH em ovários ($p = 0,0365$) e testículos ($p = 0,0136$) quando comparado ao grupo controle (Figura 3 a), enquanto apenas os ovários ($p = 0,0021$) e testículos ($p = 0,0076$) de animais tratados com 50 µg/L de ACE apresentaram menor quantidade de DNA metilado (Figura 3 b). A diminuição na metilação do DNA foi acompanhada pela redução na expressão de *dnmt1*, *dnmt3*, *dnmt5* e *dnmt8* nos ovários, ao passo que nos testículos ocorreu redução apenas de *dnmt3* e *dnmt8*, principalmente nos grupos expostos a 5 µg/L e 50 µg/L de ACE (Figura 3 c-f). Por outro lado, fêmeas e machos tiveram aumento na expressão de *tet3* no tratamento de 50 µg/L de ACE. O tratamento não resultou em alterações nos níveis de expressão de *tet1* e *tet2* (Figura 3 g-i).

Discussão

A exposição crônica a produtos farmacêuticos encontrados no ambiente aquático tem se tornado um problema ainda negligenciado pelas organizações públicas de saúde e proteção ambiental. A investigação dos efeitos multi/transgeracionais ocasionadas por contaminantes ambientais em peixes é recente e poucos estudos avaliam os efeitos na reprodução da prole. Este estudo foi o primeiro a investigar o efeito da exposição crônica de uma geração parental

ao ACE na reprodução da prole F1 e F2, e reportou que concentrações ambientalmente relevantes de ACE causam hipometilação do DNA gonadal de progenitores associadas a alterações prejudiciais na gametogênese e reprodução da prole.

O correto desenvolvimento ovocitário e folicular é guiado por um complexo equilíbrio de gonadotropinas, esteroides sexuais e fatores de crescimento. Assim como em outros vertebrados, em peixes o E_2 é um dos principais esteroides sexuais relacionados à foliculogênese, e o avanço da fase perinucleolar para a fase vitelogênica é dependente do aumento das concentrações desse hormônio (LUBZENS *et al.*, 2010). A exposição a 50 $\mu\text{g/L}$ de ACE na geração parental, diminuiu a concentração ovariana de E_2 , concomitante ao aumento na quantidade de PN e diminuição de FV na F1, o que indica falha ou atraso da foliculogênese e consequente redução da desova. Efeitos reprodutivos transgeracionais como diminuição na quantidade de células germinativas, tamanho e peso dos ovários também foram observados na F1 e F2 de ratos expostos ao ACE durante a gravidez (DEAN *et al.*, 2016), o que sugere um mecanismo de ação comum em vertebrados. Os resultados encontrados na gametogênese para fêmeas F2 foram similares aos encontrados na F1. Embora sem alterações significativas, há uma acentuada tendência à redução nos níveis de E_2 , que pode ter sido suficiente para afetar a foliculogênese e a desova na geração F2. Em conjunto esses dados revelam que a exposição parental ao ACE é capaz de provocar efeitos multi/transgeracionais, afetar a ovogênese e reduzir a capacidade reprodutiva da F1 e F2 no zebrafish. Ressalta-se que os efeitos do ACE na geração parental são diferentes do observado em sua prole. Zebrafish expostos ao ACE apresentaram aumento na proporção de FV e diminuição dos PN, ocasionado por uma possível falha na maturação final ovocitária causada pelo aumento nos níveis ovarianos de E_2 e diminuição de PGE_2 (MOREIRA *et al.*, 2022). Esses resultados demonstram que o ACE além de atuar como um desregulador endócrino, exerce efeito epigenético que afeta a reprodução da prole.

A 11-KT é um dos principais andrógenos que atua na espermatogênese de peixes, onde pode induzir a síntese de outros mediadores que atuam no avanço da fase meiótica para a espermiogênica (SCHULZ *et al.*, 2010), e a alta produção de Z está intimamente associada ao aumento de 11-KT e seu receptor (CROWDER; LASSITER; GORELICK, 2018; ZHENG *et al.*, 2020). Este estudo demonstrou que a exposição parental ao ACE resultou em menor concentração testicular de 11-KT na F1, o que pode ter contribuído para o acúmulo de C_1 , redução de Z e das taxas de fertilização na prole de progenitores expostos a 50 $\mu\text{g/L}$ de ACE. Além disso, os resultados mostraram redução da motilidade progressiva, VSL, VCL e VAP

na F1, o que reflete em baixa qualidade espermática, semelhante ao observado em peixes da geração parental (MOREIRA *et al.*, 2022) e em peixes expostos a substâncias anti-androgênicas (GOLSHAN; ALAVI, 2019). Em conjunto esses resultados indicam que a baixa fertilização observada na F1 pode ser provocada pela diminuição na quantidade e qualidade dos espermatozoides, induzidos pela exposição parental ao ACE.

Diferentemente das fêmeas, peixes machos F2 não foram afetados pela exposição de seus progenitores ao ACE, e apresentaram todos os parâmetros reprodutivos normais, semelhante ao reportado em ratos machos F1 e F2 de progenitores expostos a a 350 mg/kg/dia de ACE durante a gestação (DEAN *et al.*, 2016). Em contraste, ratos machos F1 de progenitores fêmeas expostas a 350 mg/kg/dia de ACE durante a gestação apresentaram aumento do peso testicular e do diâmetro dos túbulos seminíferos (PEREIRA *et al.*, 2020). Por outro lado, os efeitos transgeracionais da exposição ao bisphenol A foram mais acentuados em machos do que em fêmeas de zebrafish, que tiveram diminuição da densidades e qualidade espermática na F1 e F2 (CHEN *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível que efeitos transgeracionais sejam sexo-dependente e variam com o fármaco e a espécie analisada.

É bem estabelecido que a formação excessiva de NAPQI após overdose ou exposição crônica ao ACE, gera estresse oxidativo e reduz os níveis de GSH (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016) e, como esperado, o tratamento levou a redução acentuada de GSH em ovários e testículos nos grupos 50 µg/L ACE. O padrão de metilação do DNA pode ser alterado por causa da depleção de GSH quando esta é conjugada cronicamente a substâncias tóxicas e seus metabólitos, uma vez que a produção de GSH e SAM são dependentes de homocisteína (LEE; JR; PORTA, 2009). De fato, os resultados desse estudo apontaram que a exposição a 50 µg/L de ACE acarreta hipometilação global do DNA nos ovários e testículos, o que evidencia a capacidade da exposição crônica ao ACE induzir alterações epigenéticas.

Em teleósteos, alterações nos níveis de metilação global após exposição a EDCs foram associadas a expressão de mRNA para proteínas das famílias *dnmt1* e *dnmt3* (LIU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014), que são, respectivamente, necessárias para manutenção e estabelecimento dos padrões de metilação do DNA (CAMPOS; VALENTE; FERNANDES, 2012). Nesse estudo, o tratamento com 50 µg/L de ACE resultou em downregulation de *dnmt1*, *dnmt3*, *dnmt5* e *dnmt8* em ovários, que pode inibir a manutenção da metilação e a metilação *de novo* do DNA, ao passo que *dnmt3* e *dnmt8* foram reduzidas em testículos, o que indica apenas inibição da metilação *de novo* do DNA. Além disso, os resultados mostram upregulation de *tet3*, uma enzima que promove a desmetilação do DNA, nos ovários e

testículos de peixes expostos a 50 µg/L de ACE, que é consistente com a redução da metilação global do DNA observada. Hipometilação global do DNA com downregulation de DNMTs e upregulation de TETs, também foi observado em zebrafish expostos ao bisfenol-A (LIU *et al.*, 2016), e medaka expostos ao glifosato (SMITH; VERA; BHANDARI, 2019) e triclosan (SONG; WANG; BHANDARI, 2020), o que sugere que alterações epigenéticas podem ser frequentes para compostos tóxicos. Em conjunto, esses resultados demonstram que a exposição crônica ao ACE altera a expressão das metiltransferases e acarreta hipometilação do DNA, que pode estar relacionadas com alterações reprodutivas da prole.

Em resumo, a exposição crônica de uma geração parental ao ACE afeta negativamente a reprodução da prole, com redução de E₂ e diminuição da desova na F1 e F2. Diferentemente das fêmeas, os níveis de 11-KT e a espermatogênese não foram afetados nos machos da geração F2, o que pode sugerir que as fêmeas são mais sensíveis a alterações epigenéticas causadas pelo ACE do que os machos. Os resultados desse estudo também mostraram que o ACE provoca redução dos níveis de GSH e na expressão de genes da família das DNMTs concomitante ao aumento de *tet3* na geração parental, resultando em um quadro de hipometilação global do DNA em ovários e testículos de peixes expostos ao ACE. Em conjunto, este estudo demonstrou que a exposição crônica ao ACE é capaz de induzir alterações epigenéticas na F0 e reduzir a capacidade reprodutiva da F1 e F2 do zebrafish. Portanto, avaliações multi/transgeracionais são elementos-chave para determinar a magnitude dos efeitos adversos da contínua exposição de poluentes emergentes nas populações dos organismos aquáticos.

Tabela 1: Parâmetros de qualidade da água de 2 gerações (F1 e F2) de zebrafish onde a geração parental foi exposta a diferentes concentrações de Acetaminofeno (ACE) durante 60 dias.

	F1				F2			
	Controle	0,5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE	Controle	0,5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Temperatura (°C) *	27,8 ± 0,5	27,6 ± 0,4	28,1 ± 0,3	27,9 ± 0,2	28,2 ± 0,3	27,9 ± 0,2	27,6 ± 0,3	27,9 ± 0,3
pH *	7,81 ± 0,07	7,72 ± 0,06	7,64 ± 0,05	7,70 ± 0,04	7,73 ± 0,05	7,81 ± 0,06	7,70 ± 0,05	7,72 ± 0,04
Oxigênio (mg/L) *	6,64 ± 0,19	6,43 ± 0,29	6,89 ± 0,25	6,73 ± 0,26	6,75 ± 0,24	6,68 ± 0,22	6,76 ± 0,23	6,76 ± 0,25
Amônia (mg/L) *	0,016 ± 0,004	0,017 ± 0,003	0,020 ± 0,003	0,018 ± 0,005	0,019 ± 0,007	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,005	0,021 ± 0,007

Valores representam média ± erro padrão. * Sem diferença significativa entre os tratamentos, $p > 0,05$.

Tabela 2: Primers usados nas análises de PCR em tempo real para enzimas que metilam (dnmt1, dnmt3, dnmt5, dnmt8) e desmetilam o DNA (tet1, tet2, tet3), e genes referência (18S rRNA, actb2) nas gônadas de zebrafish após 60 dias de exposição a diferentes concentrações de acetaminofeno.

Gene	Sequência forward	Sequência reverse	Referência
dnmt1	AGACAATGGCGAACAGGAGG	GGCTGGAGATTTCTTGGGCT	González-Rojo et al. 2019
dnmt3	CTGCTGTCGCTCTTTCTGTG	TGGATAGCAGGGATTGATGG	González-Rojo et al. 2019
dnmt5	TCATTGACTTGGGGGAAGAG	GCTGCTGCTGCACTTATCAT	González-Rojo et al. 2019
dnmt8	CACAACTCGCTCAAACCTCCA	TGATCTACCCAGCAGCCTCT	González-Rojo et al. 2019
tet1	GCAACCACTCCCATCCTTCGAC	TGTTAGCGACTGACGGGTAGGGAC	Ge et al. 2014
tet2	CCAACAGTGACAGGACGAGG	TTGAATAGGGTGAGGGAGCAT	Ge et al. 2014
tet3	CACTCACCCAAGCCGCATATC	AGGAGTAAGATTTATGACCCTTATC	Ge et al. 2014
18S rRNA	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	CGGACATCTAAGGGCATCAC	González-Rojo et al. 2019
actb2	CGAGCTGTCTTCCCATCCA	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	Riesco and Robles 2013

Tabela 3: Dados biométricos, índice gonadosomático e proporção (%) de folículos ovarianos e células germinativas testiculares em diferentes estágios de desenvolvimento de 2 gerações (F1 e F2) de fêmeas e machos de zebrafish onde a geração parental foi exposta a diferentes concentrações de Acetaminofeno (ACE) durante 60 dias.

Fêmeas	F1				F2			
	Controle	0,5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE	Controle	0,5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Comprimento total (cm)	4,04 ± 0,06^b	4,17 ± 0,06 ^{ab}	4,18 ± 0,06 ^{ab}	4,27 ± 0,04^a	3,99 ± 0,05 ^a	4,04 ± 0,05 ^a	3,98 ± 0,07 ^a	4,08 ± 0,08 ^a
Peso corporal (g)	0,90 ± 0,04^a	0,92 ± 0,03 ^a	0,93 ± 0,03 ^{ab}	0,97 ± 0,05^b	0,93 ± 0,03 ^a	0,90 ± 0,04 ^a	0,93 ± 0,03 ^a	0,93 ± 0,05 ^a
Índice gonadosomático (IGS)	12,01 ± 0,84^a	12,11 ± 1,34 ^a	8,74 ± 0,86 ^{ab}	7,87 ± 0,71^b	13,99 ± 1,25^a	15,05 ± 1,52 ^a	11,08 ± 1,67 ^{ab}	9,20 ± 0,98^b
Ovogônias	0,58 ± 0,15 ^a	0,50 ± 0,16 ^a	0,67 ± 0,19 ^a	0,70 ± 0,18 ^a	0,71 ± 0,18 ^a	0,66 ± 0,19 ^a	0,67 ± 0,18 ^a	0,78 ± 0,15 ^a
Folículos perinucleolares	15,35 ± 1,5^b	14,49 ± 1,13 ^b	20,77 ± 0,95 ^a	26,91 ± 0,80^a	14,97 ± 1,14^b	19,53 ± 1,01 ^b	18,20 ± 1,42 ^a	24,69 ± 1,41^a
Folículos com vesículas corticais	19,14 ± 1,07 ^{ab}	16,42 ± 1,11 ^b	17,90 ± 0,88 ^b	21,7 ± 0,66 ^a	21,08 ± 0,93^a	18,75 ± 0,85 ^{ab}	19,53 ± 0,91 ^{ab}	16,86 ± 1,09^b
Folículos vitelogênicos	49,76 ± 1,47^a	54,30 ± 2,09 ^a	41,86 ± 2,55 ^b	33,08 ± 2,07^b	48,65 ± 1,69^a	46,07 ± 1,50 ^{ab}	45,47 ± 2,17 ^{ab}	39,15 ± 2,50^b
Folículos pós-ovulatórios	2,44 ± 0,38^a	1,91 ± 0,36 ^{ab}	1,85 ± 0,40 ^{ab}	0,96 ± 0,25^b	2,32 ± 0,41^a	1,99 ± 0,46 ^{ab}	2,02 ± 0,36 ^{ab}	0,81 ± 0,24^b
Folículos atrésicos	2,63 ± 0,80 ^a	4,05 ± 0,95 ^a	4,36 ± 1,18 ^a	2,56 ± 0,74 ^a	2,88 ± 0,78 ^a	3,60 ± 0,98 ^a	3,02 ± 0,86 ^a	3,73 ± 1,00 ^a
Tecido intersticial	10,41 ± 0,82 ^{ab}	8,81 ± 0,66 ^b	11,98 ± 1,16 ^{ab}	13,84 ± 1,05 ^a	9,38 ± 0,66 ^a	9,40 ± 0,68 ^a	11,01 ± 0,94 ^a	13,97 ± 1,79 ^a
Machos								
Comprimento total (cm)	3,76 ± 0,0^b	3,81 ± 0,05 ^b	3,92 ± 0,05 ^{ab}	4,01 ± 0,05^a	3,96 ± 0,04 ^a	3,91 ± 0,04 ^a	3,93 ± 0,04 ^a	3,80 ± 0,03 ^a
Peso corporal (g)	0,56 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,02 ^a	0,55 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,02 ^a	0,55 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,03 ^a
Índice gonadosomático (IGS)	1,49 ± 0,84 ^a	1,37 ± 0,16 ^a	1,54 ± 0,18 ^a	1,39 ± 0,11 ^a	1,73 ± 0,22 ^a	1,73 ± 0,26 ^a	2,14 ± 0,29 ^a	1,80 ± 0,22 ^a
Espermatogônias indiferenciada A	0,63 ± 0,11 ^a	0,57 ± 0,13 ^a	0,75 ± 0,12 ^a	0,82 ± 0,14 ^a	0,84 ± 0,13 ^a	0,69 ± 0,10 ^a	0,65 ± 0,15 ^a	0,77 ± 0,15 ^a
Espermatogônias diferenciada A	5,35 ± 0,55 ^a	5,75 ± 0,36 ^a	6,18 ± 0,53 ^a	5,86 ± 0,68 ^a	4,99 ± 0,42 ^a	5,31 ± 0,45 ^a	5,98 ± 0,52 ^a	6,73 ± 0,71 ^a
Espermatogônias B	10,50 ± 0,85 ^a	11,10 ± 0,83 ^a	12,01 ± 0,79 ^a	12,05 ± 1,24 ^a	10,92 ± 0,87 ^a	11,49 ± 0,78 ^a	12,55 ± 0,83 ^a	10,81 ± 1,21 ^a

Espermatócitos primário	26,28 ± 1,28^b	21,62 ± 1,54 ^b	30,49 ± 1,24 ^{ab}	33,23 ± 1,57^a	23,80 ± 0,82 ^a	25,49 ± 1,40 ^a	26,12 ± 1,48 ^a	25,50 ± 1,72 ^a
Espermatócitos secundário	3,16 ± 0,53 ^a	2,88 ± 0,58 ^a	3,05 ± 0,39 ^a	2,92 ± 0,55 ^a	3,41 ± 0,51 ^a	3,15 ± 0,59 ^a	3,11 ± 0,48 ^a	2,34 ± 0,46 ^a
Espermátides	9,28 ± 0,66 ^a	10,72 ± 0,59 ^a	8,87 ± 0,71 ^a	8,00 ± 0,84 ^a	8,73 ± 0,76 ^a	9,93 ± 0,67 ^a	10,07 ± 0,73 ^a	8,07 ± 0,67 ^a
Espermatozoides	34,81 ± 1,57^a	36,94 ± 2,54 ^a	29,74 ± 2,15 ^{ab}	26,86 ± 2,00^b	38,03 ± 1,36 ^a	33,86 ± 1,90 ^a	32,25 ± 1,92 ^a	35,01 ± 2,28 ^a
Células de Sertoli	2,30 ± 0,16 ^a	2,20 ± 0,14 ^a	2,33 ± 0,25 ^a	2,98 ± 0,35 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	2,05 ± 0,26 ^a	2,14 ± 0,21 ^a	2,45 ± 0,27 ^a
Células de Leydig	1,09 ± 0,16 ^a	0,93 ± 0,15 ^a	0,85 ± 0,12 ^a	0,84 ± 0,11 ^a	2,19 ± 0,18 ^a	2,48 ± 0,27 ^a	2,36 ± 0,26 ^a	2,5 ± 0,25 ^a
Tecido intersticial	4,76 ± 0,46 ^a	5,32 ± 0,55 ^a	3,82 ± 0,39 ^a	5,46 ± 0,59 ^a	4,25 ± 0,43 ^a	5,01 ± 0,57 ^a	5,31 ± 0,53 ^a	5,67 ± 0,60 ^a
Lúmen	2,08 ± 0,35 ^a	1,97 ± 0,62 ^a	1,93 ± 0,45 ^a	0,97 ± 0,86 ^a	1,94 ± 0,44 ^a	2,14 ± 0,46 ^a	1,08 ± 0,86 ^a	1,97 ± 0,57 ^a

Valores representam média ± erro padrão. Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$)

Tabela 4: Parâmetros de motilidade espermática de Zebrafish onde a geração parental foi exposta a diferentes concentrações de Acetaminofeno (ACE) durante 60 dias.

	Tempo	Controle	0.5 µg/L ACE	5 µg/L ACE	50 µg/L ACE
Motilidade não progressiva (%)	15	64.33 ± 2.84	53.75 ± 4.70	59.44 ± 3.22	56.77 ± 3.04
	30	52.03 ± 2.95	45.82 ± 3.97	50.07 ± 3.39	51.64 ± 3.02
	45	65.68 ± 3.08	63.78 ± 4.56	59.49 ± 3.24	66.49 ± 3.16
	60	65.06 ± 2.80	62.77 ± 2.54	58.52 ± 2.99	62.59 ± 2.73
	180	11.37 ± 5.84^b	7.64 ± 1.34 ^b	9.69 ± 1.17 ^b	35.59 ± 3.82^a
Motilidade progressiva (%)	15	30.49 ± 1.48	35.72 ± 2.42	32.04 ± 1.92	37.24 ± 2.40
	30	40.17 ± 1.70	38.53 ± 1.75	32.46 ± 2.66	36.99 ± 2.48
	45	18.61 ± 3.22	10.97 ± 2.65	11.38 ± 2.06	12.46 ± 2.51
	60	7.23 ± 2.25^a	1.72 ± 0.90 ^b	2.82 ± 0.54^b	1.89 ± 0.38^b
	180	1.02 ± 0.47^a	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01^b	0.18 ± 0.16^b
VSL (µm/s)	15	62.71 ± 2.67 ^{ab}	69.51 ± 3.83 ^a	56.33 ± 3.29 ^b	66.97 ± 3.56 ^{ab}
	30	49.91 ± 1.81	46.61 ± 2.87	40.68 ± 2.87	45.02 ± 2.51
	45	27.63 ± 1.93	24.39 ± 2.10	23.64 ± 1.57	24.94 ± 1.84
	60	17.72 ± 1.81	13.32 ± 1.29	14.56 ± 1.01	13.16 ± 1.01
	180	7.43 ± 1.41^a	8.65 ± 0.31 ^a	3.74 ± 0.29^b	3.97 ± 0.72^b
VCL (µm/s)	15	111.00 ± 3.09	108.46 ± 2.32	95.03 ± 4.38	105.12 ± 3.29
	30	74.59 ± 2.64	62.93 ± 5.87	67.44 ± 3.32	63.71 ± 3.26
	45	39.92 ± 2.67	34.25 ± 1.90	33.77 ± 1.38	35.65 ± 2.36
	60	27.94 ± 2.17^a	22.52 ± 1.03 ^b	24.72 ± 0.76 ^{ab}	22.65 ± 1.21^b
	180	19.10 ± 1.08^a	15.37 ± 0.40 ^b	16.07 ± 0.33^b	16.36 ± 0.75^b
VAP (µm/s)	15	91.49 ± 2.99	92.54 ± 2.81	87.77 ± 4.10	91.26 ± 3.48
	30	65.34 ± 2.35	56.53 ± 2.89	55.87 ± 3.32	57.16 ± 3.02
	45	34.61 ± 2.42	29.62 ± 2.06	28.94 ± 1.53	31.23 ± 2.30
	60	22.81 ± 2.12^a	17.30 ± 1.27 ^b	18.97 ± 0.98 ^{ab}	17.33 ± 1.19^b
	180	11.22 ± 1.52^a	9.64 ± 0.37 ^{ab}	7.43 ± 0.36^b	7.54 ± 0.85^b

Valores representam média ± erro padrão. Em cada linha, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

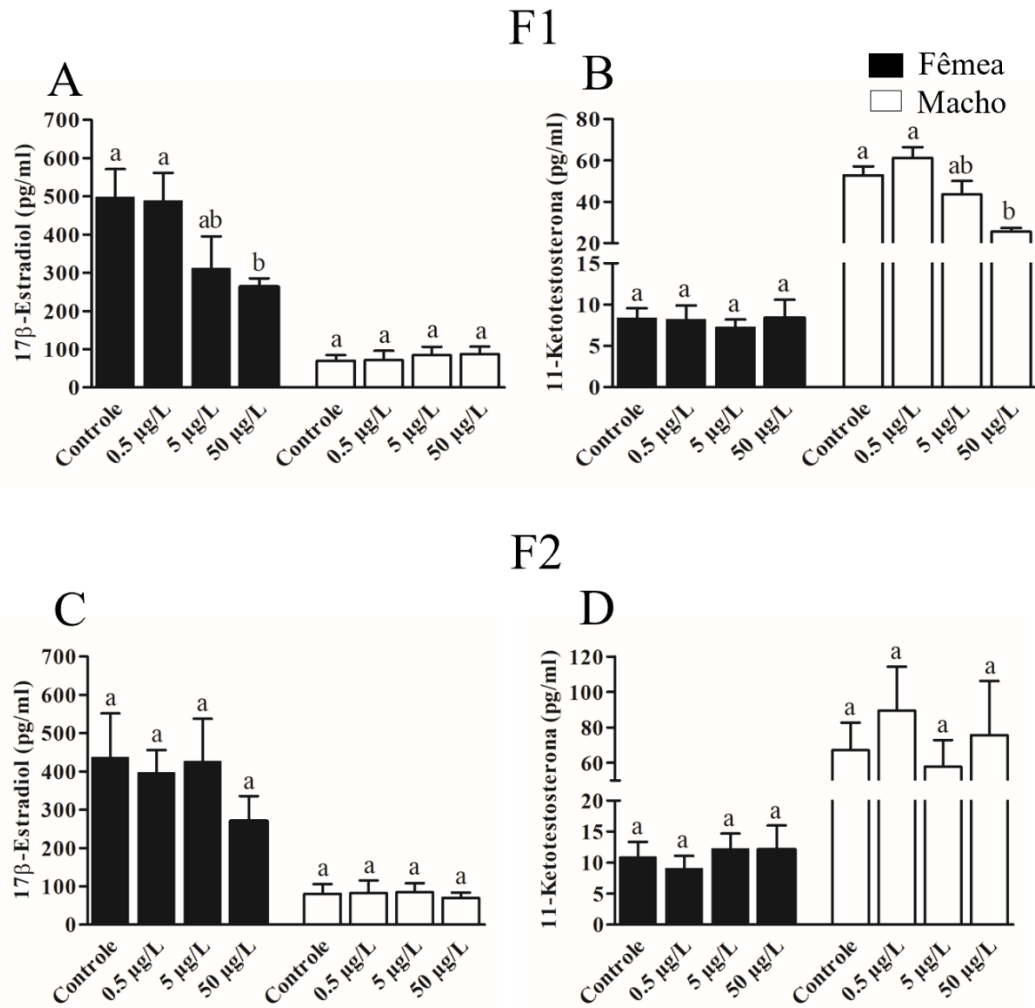


Fig. 1 Concentrações gonadais de 17 β -estradiol (A,C) e 11-Ketotestosterona (B,D) na prole (F1 e F2) de zebrafish cujos progenitores foram expostos ao Acetaminofeno por 60 dias. Valores representam média \pm erro padrão. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$; One-way Anova ou Kruskal-Wallis).

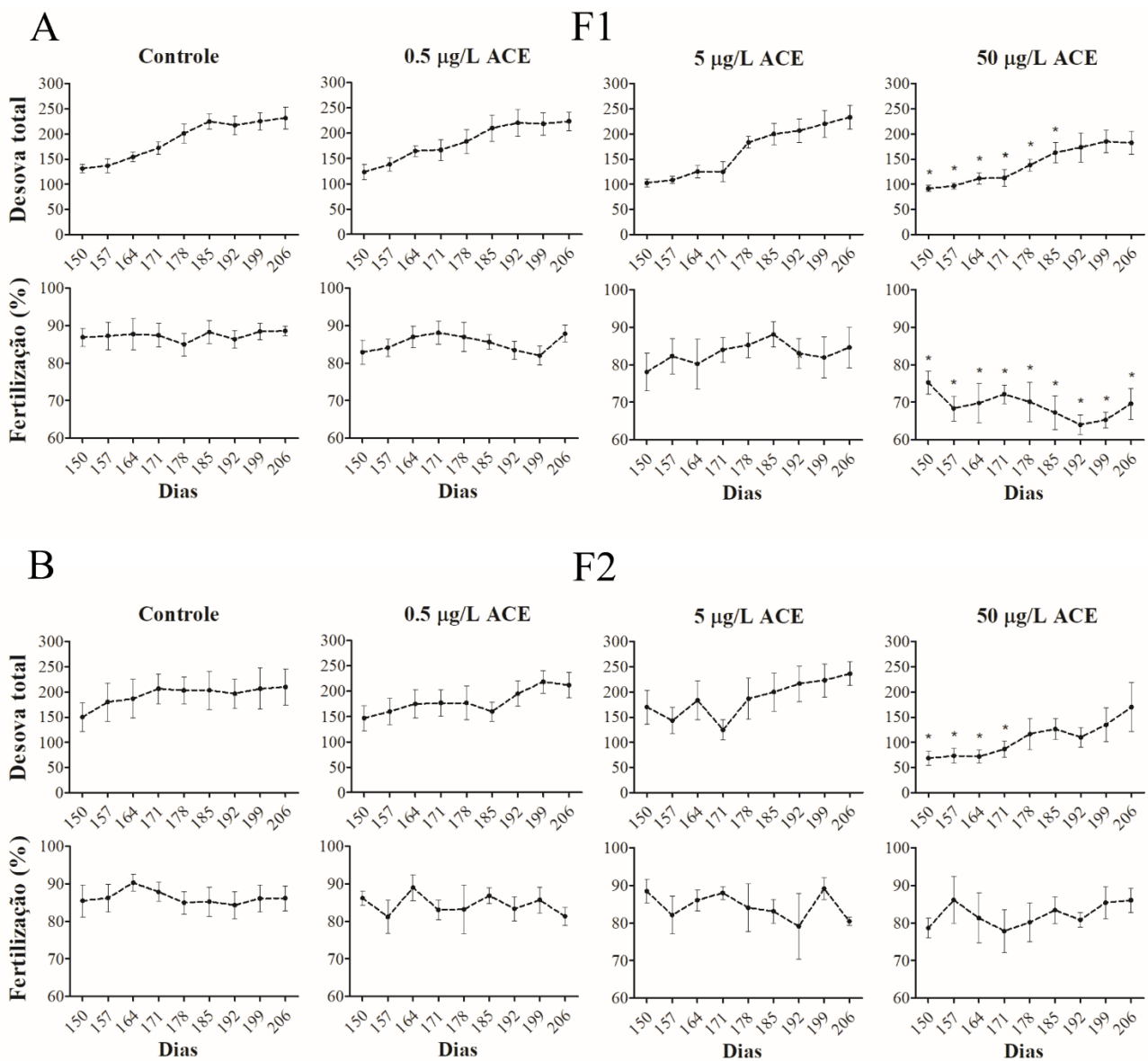


Fig. 2 Número total de ovos desovados e taxa de fertilização na prole (F1 e F2) de zebrafish cujos progenitores foram expostos ao Acetaminofeno por 60 dias. Valores representam média \pm erro padrão. (*) indica diferenças significativas comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; teste t).

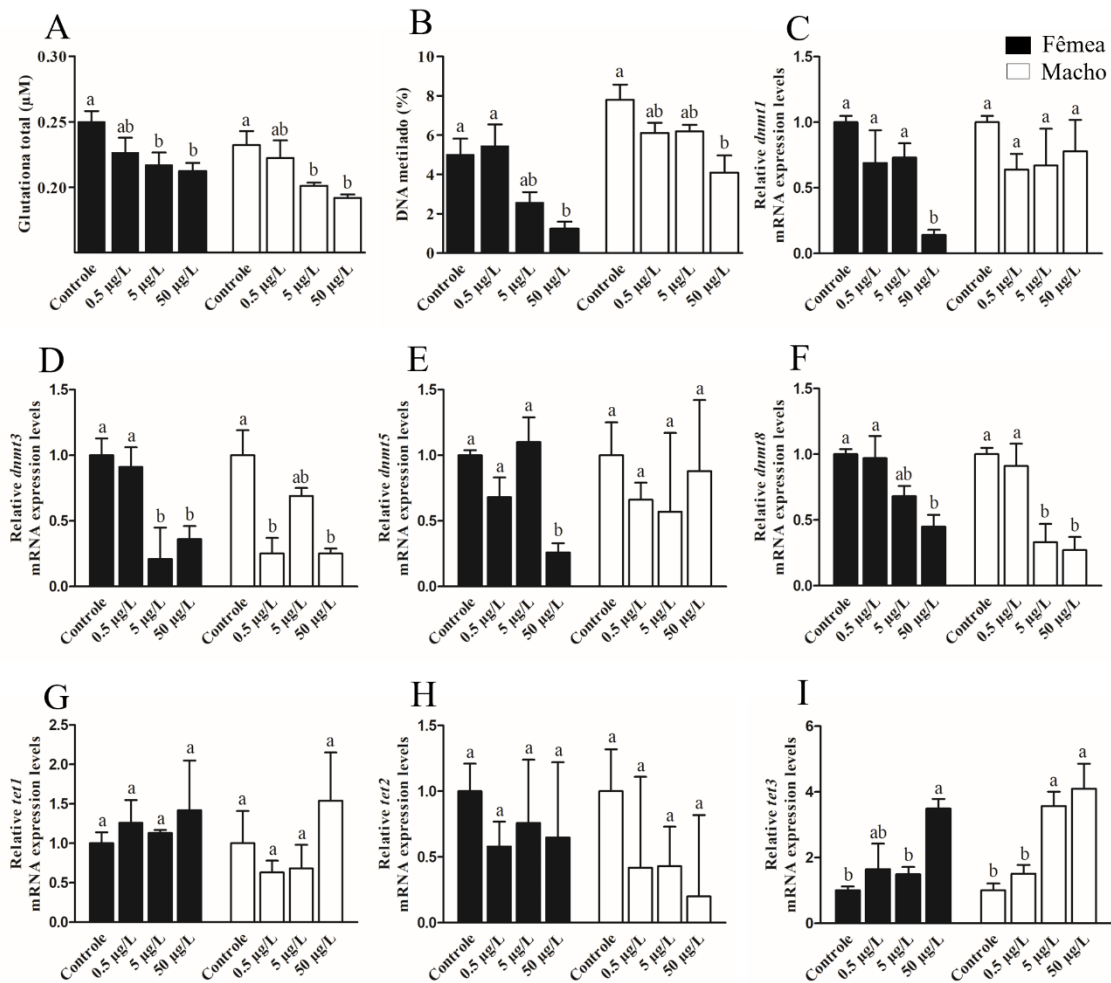


Fig. 3 Concentrações gonadais de **A** glutatona, **B** DNA metilado e expressão relativa das **C-G** DNA metiltransferases e das **H-J** ten-eleven translocation na prole (F1 e F2) de zebrafish cujos progenitores foram expostos ao Acetaminofeno por 60 dias. Valores representam média \pm erro padrão. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$; One-way Anova ou Kruskal-Wallis).

Referências

- ADAMS, C. *et al.* Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes. *Journal of Environmental Engineering*, v. 128, n. 3, p. 253–260, 2002.
- AKHTER, Afroza *et al.* Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. *Heliyon*, v. 4, n. 9, 2018.
- AKSU, E. H. *et al.* Mitigation of paracetamol-induced reproductive damage by chrysin in male rats via reducing oxidative stress. *Andrologia*, v. 48, n. 10, p. 1145–1154, 2016.
- AL-ANSARI, Ahmed M. *et al.* Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 β -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environmental Pollution*, v. 158, n. 8, p. 2566–2571, 2010.
- ANWAY, Matthew D. *et al.* Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, v. 308, n. 5727, p. 1466–1469, 2005.
- ANWAY, Matthew D.; LEATHERS, Charles; SKINNER, Michael K. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*, v. 147, n. 12, p. 5515–5523, 2006.
- AVDESH, Avdesh *et al.* Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory : An Introduction. n. November, 2012.
- AYOBAHAN, Steve U. *et al.* Detection of biomarkers to differentiate endocrine disruption from hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) using proteomics. *Chemosphere*, v. 240, p. 1–12, 2020.
- BAHAMONDE, P. A. *et al.* Whole organism responses and intersex severity in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part A. *Aquatic Toxicology*, v. 159, p. 290–301, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.023>>.
- BANIHANI, S A. Effect of paracetamol on semen quality. *Andrologia*, v. 1, n. May, p. 1–4, 2017.
- BAUMANN, Lisa *et al.* Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (*Danio rerio*)? *Chemosphere*, v. 238, p. 124589, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124589>>.
- BOUND, Jonathan P.; VOULVOULIS, Nikolaos. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 12, p. 1705–1711, 2005.
- CAMPANHA, Mariele B *et al.* A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. p. 7936–7947, 2015.

- CAMPOS, Catarina; VALENTE, Luisa M.P.; FERNANDES, Jorge M.O. Molecular evolution of zebrafish *dnmt3* genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. *Gene*, v. 500, n. 1, p. 93–100, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.041>>.
- CAPPARELLI, Mariana V. *et al.* Emerging Contaminants in the Northeast Andean Foothills of Amazonia: The Case of Study of the City of Tena, Napo, Ecuador. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 107, n. 1, p. 2–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-021-03275-8>>.
- CHEN, Jiangfei *et al.* Reproductive toxicity of low level bisphenol A exposures in a two-generation zebrafish assay: Evidence of male-specific effects. *Aquatic Toxicology*, v. 169, p. 204–214, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.020>>.
- COWIN, Prue A. *et al.* Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism. *Endocrinology*, v. 151, n. 2, p. 783–792, 2010.
- CRESPO, Diego *et al.* PGE2 inhibits spermatogonia differentiation in zebrafish: interaction with Fsh and an androgen. *Journal of Endocrinology*, v. 244, n. 1, p. 163–175, 2020.
- CROWDER, Camerron M.; LASSITER, Christopher S.; GORELICK, Daniel A. Nuclear Androgen Receptor Regulates Testes Organization and Oocyte Maturation in Zebrafish. *Endocrinology*, v. 159, n. 2, p. 980–993, 2018.
- DAMSTRA, Terri *et al.* Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2*, p. 180, 2002.
- DEAN, Afshan *et al.* Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Scientific Reports*, n. January, p. 1–12, 2016.
- DRUMMOND, Cristina Delaerte *et al.* Postovulatory Follicle: A Model for Experimental Studies of Programmed Cell Death or Apoptosis in Teleosts. *Zoology*, n. 287, p. 176–182, 2000.
- DU, Kuo; RAMACHANDRAN, Anup; JAESCHKE, Hartmut. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*, v. 10, n. September, p. 148–156, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>>.
- FARRELL, Susan E. Acetaminophen Toxicity. *Journal for Nurse Practitioners*, v. 3, n. 3, p. 186–188, 2021.
- FEINBERG, Andrew P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, v. 447, n. 7143, p. 433–440, 2007.
- FICK, Jerker *et al.* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment

CONTAMINATION OF SURFACE, GROUND, AND DRINKING WATER FROM PHARMACEUTICAL PRODUCTION. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, v. 28, n. 12, p. 2522–2527, 2009.

FLINT, Shelby *et al.* Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, v. 104, p. 19–34, 2012.

GALUS, Michal; KIRISCHIAN, Nina; *et al.* Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p. 200–211, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>>.

GALUS, Michal; KIRISCHIAN, Nina; *et al.* Chronic , low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p. 200–211, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>>.

GALUS, Michal; JEYARANJAN, Judy; *et al.* Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p. 212–222, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.016>>.

GATIDOU, Georgia *et al.* Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1138, n. 1–2, p. 32–41, 2007.

GE, Liang *et al.* TET2 Plays an Essential Role in Erythropoiesis by Regulating Lineage-Specific Genes via DNA Oxidative Demethylation in a Zebrafish Model. *Molecular and Cellular Biology*, v. 34, n. 6, p. 989–1002, 2014.

GERVIN, Kristina *et al.* Long-term prenatal exposure to paracetamol is associated with DNA methylation differences in children diagnosed with ADHD. *Clinical Epigenetics*, v. 9, n. 77, p. 1–9, 2017.

GOLL, Mary; HALPERN, Marnie. DNA Methylation in Zebrafish. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 79, n. 2, p. 211–227, 2015.

GOLSHAN, M.; ALAVI, Sayyed Mohammad Hadi. Androgen signaling in male fishes: Examples of anti-androgenic chemicals that cause reproductive disorders. *Theriogenology*, v. 139, p. 58–71, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.020>>.

GÓMEZ, M. J. *et al.* Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, v. 66, n. 6, p. 993–1002, 2007.

GONZÁLEZ-ROJO, S. *et al.* Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, v. 248, p. 368–379, 2019.

GOODHEAD, R M; TYLER, C R. Endocrine-Disrupting Chemicals and Their Environmental

Impacts. *Organic Pollutants*. [S.l.]: CRC Press, 2008. p. 265–292.

GOTTLIEB, C. *et al.* Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphate content. *Fertility and Sterility*, v. 49, n. 2, p. 322–327, 1988.
Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59723-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59723-4)>.

GUILOSKI, Izonete *et al.* Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 53, n. May, p. 111–120, 2017.

HOO, Jing Ying *et al.* Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. *BioMed Research International*, v. 2016, 2016.

HUTCHINSON, Thomas H. *et al.* Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n. SUPPL.1, p. 106–114, 2006.

JOZWIAK-BEBENISTA, Marta; NOWAK, Jerzy Z. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 71, n. 1, p. 11–23, 2014.

KAMSTRA, Jorke H. *et al.* Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 21, p. 16262–16276, 2015.

KOÇ, Nazan Deniz; AYTEKIN, Yener; YÜCE, Rikap. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 3, p. 513–522, 2008.

KWONG, Raymond W. M. *et al.* Uptake, elimination, and biotransformation of aqueous and dietary DDT in marine fish. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, v. 27, n. 10, p. 2053–2063, 2008.

LAU, Stephanie M.; MCGUIRE, Treasure M.; VAN DRIEL, Mieke L. Consumer concerns about paracetamol: A retrospective analysis of a medicines call centre. *BMJ Open*, v. 6, n. 6, p. 1–8, 2016.

LEE, Duk-hee; JR, David R Jacobs; PORTA, Miquel. Commentary Hypothesis : a Unifying Mechanism for Nutrition and Chemicals as Lifelong Modulators of DNA Hypomethylation. *Environmental Health Perspectives*, v. 117, n. 12, p. 1799–1802, 2009.

LEGRAND, A *et al.* Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human Reproduction*, v. 28, n. 7, p. 1890–1898, 2013.

LIU, Yan *et al.* Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 130, p. 124–132, 2016.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.012>>.

LUBZENS, Esther *et al.* Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>>.

LV, Xuemin *et al.* Occurrence and removal of phenolic endocrine disrupting chemicals in the water treatment processes. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 22860, 2016.

MORAIS, R. D.V.S. *et al.* Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 454, p. 112–124, 2017a.

MORAIS, R. D.V.S. *et al.* Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 454, p. 112–124, 2017b.

MOREIRA, Davidson Peruci *et al.* Exposure to acetaminophen impairs gametogenesis and fertility in zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Toxicology*, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-022-03390-3>>.

MORTHORST, Jane E. *et al.* Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 157, n. 2, p. 251–257, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.12.001>>.

NELSON, Erik R.; HABIBI, Hamid R. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, v. 192, p. 15–24, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032>>.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 197–206, 2009.

OVERTURF, Matthew D. *et al.* Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 45, n. 6, p. 469–491, 2015.

OZANNE, Susan E.; CONSTÂNCIA, Miguel. Mechanisms of Disease: The developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, v. 3, n. 7, p. 539–546, 2007.

PASCHOALINI, Alessandro Loureiro *et al.* Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 47, n. 4, p. 797–810, 2021.

PEREIRA, Marina Rangel Ferro *et al.* Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring? *Reproductive Toxicology*, v. 93, n. January, p. 68–74, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.12.007>>.

POLEO, G. A. *et al.* Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 961–966, 2001.

PORTA, Miquel *et al.* Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: The international experience. *Environment International*, v. 34, n. 4, p. 546–561, 2008.

PRADO, Paula S. *et al.* Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environmental Research*, v. 131, p. 165–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.002>>.

PRZYBYŁA, Grzegorz W.; SZYCHOWSKI, Konrad A.; GMIŃSKI, Jan. Paracetamol – An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 48, n. 1, p. 3–19, 2021.

QIE, Yu *et al.* Environmental Estrogens and Their Biological Effects through GPER Mediated Signal Pathways. *Environmental Pollution*, v. 278, p. 116826, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116826>>.

RIBEIRO, Yves Moreira *et al.* Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 224, n. April, 2021.

RIBEIRO, Yves Moreira *et al.* Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and sperm quality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 98, n. June 2022, 2023.

RIESCO, Marta F.; ROBLES, Vanesa. Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. 1–9, 2013.

RIOS, Mariana *et al.* Low physiological levels of prostaglandins E2 and F2 α improve human sperm functions. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 4, p. 434–439, 2016.

ROBAIRE, Bernard *et al.* A cross-species comparative approach to assessing multi- and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals. *Environmental Research*, v. 204, 2022.

SANTOS, H. B. *et al.* Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology*, v. 67, n. 5, p. 1446–1459, 2005.

SCHULZ, Rüdiger W. *et al.* Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.

SCOTT, Graham R.; SLOMAN, Katherine A. *The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. Aquatic Toxicology*. [S.l: s.n.], 2004

SHARMA, Chhatra Mani *et al.* Bioaccumulation of organochlorine pollutants in the fish community in Lake Årungen, Norway. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 8–9, p. 2452–2458, 2009.

SHIMODA, Nobuyoshi *et al.* Identification of a gene required for de novo DNA methylation of the zebrafish no tail gene. *Developmental Dynamics*, v. 233, n. 4, p. 1509–1516, 2005.

SILVA, Paula *et al.* Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads-A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquatic Toxicology*, v. 124–125, p. 1–10, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.002>>.

SMITH, Chelsea M.; VERA, Madeline K.M.; BHANDARI, Ramji K. Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, v. 210, n. March, p. 215–226, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005>>.

SONG, Xiaohong; WANG, Xuegeng; BHANDARI, Ramji K. Developmental abnormalities and epigenetic alterations in medaka (*Oryzias latipes*) embryos induced by triclosan exposure. *Chemosphere*, v. 261, p. 127613, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127613>>.

TAKAHASHI, Takayuki; HAGIWARA, Akane; OGIWARA, Katsueki. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 461, p. 236–247, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.019>>.

TANG, Haipei *et al.* Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Scientific Reports*, v. 6, n. December 2015, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep28545>>.

TAYLOR, Sean C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>>.

VLIEGENTHART, A D Bastiaan *et al.* Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *British journal of clinical pharmacology*, v. 78, n. 6, p. 1217–1227, 2014.

WEBER, André Alberto *et al.* Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 279, n. December 2018, p. 99–108, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yggen.2018.12.016>>.

WEBER, André Alberto *et al.* Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Science of*

the Total Environment, v. 592, p. 693–703, 2017.

ZEMACH, Assaf *et al.* Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, v. 328, n. 5980, p. 916–919, 2010.

ZHANG, Xiaoning *et al.* 2,4-Dichlorophenol induces global DNA hypermethylation through the increase of S-adenosylmethionine and the upregulation of DNMTs mRNA in the liver of goldfish *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 160, n. 1, p. 54–59, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.11.008>>.

ZHENG, Qiaoyuan *et al.* Loss of Cyp11c1 causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *Journal of Endocrinology*, v. 244, n. 3, p. 487–499, 2020.

ŻUR, Joanna *et al.* Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 21498–21524, 2018.

DISCUSSÃO GERAL

Na última década, uma quantidade significativa de estudos tem sido realizada para investigar os riscos apresentados por produtos farmacêuticos, agrotóxicos, plastificantes e hormônios para o meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos. Essas substâncias constituem numerosas classes químicas com propriedades físico-químicas e atividades biológicas únicas. Os produtos farmacêuticos são usados para tratar e prevenir doenças em humanos e animais, e geralmente são classificados de acordo com sua função terapêutica (OVERTURF *et al.*, 2015). Uma consequência inevitável do aumento do uso dos produtos farmacêuticos é a contaminação do meio ambiente, embora as concentrações relatadas na maioria dos ambientes aquáticos sejam geralmente baixas, de ng/L a mg/L e variam muito de concentração ao longo do tempo. As rotas mais comuns para entrada desses produtos nos sistemas aquáticos são através da excreção humana, eliminação incorreta dos medicamentos no esgoto doméstico e escape das plantas produtivas de indústrias farmacêuticas (BOUND; VOULVOULIS, 2005; FICK *et al.*, 2009). Uma vez no ambiente aquático, essas substâncias podem interagir com o sistema endócrino de animais como os peixes, e provocar inúmeras alterações metabólicas e funcionais nos sistemas orgânicos.

O ACE é o segundo AINEs mais consumido no mundo, ficando atrás apenas da aspirina, e por ser cada vez mais identificado nos ambientes aquáticos, é considerado um contaminante emergente (OVERTURF *et al.*, 2015). Embora seja um dos mais seguros AINEs prescrito para uso humano, o ACE pode se tornar hepatotóxico após overdose ou quando administrado em grupos de risco (FARRELL, 2021). No zebrafish, o ACE também exerce efeitos hepatotóxicos, além de provocar graves efeitos reprodutivos (BAUMANN *et al.*, 2020; GALUS; KIRISCHIAN; *et al.*, 2013a). Os efeitos do ACE na fisiologia dos peixes foram pouco estudados e o presente trabalho foi o primeiro a integrar alterações histológicas, hormonais, expressão gênica de receptores de hormônios, produção de embriões, taxa de fertilização, qualidade de sêmen, além de investigar efeitos transgeracionais da exposição crônica ao ACE.

Na primeira etapa do presente estudo, os principais efeitos encontrados foram nos grupos de 5 e 50 µg/L, que está dentro de um intervalo de concentrações já encontradas em ambientes aquáticos no Brasil, países europeus e asiáticos (CAMPANHA *et al.*, 2015; ŽUR *et al.*, 2018), indicando riscos para a ictiofauna desses locais. A exposição crônica ao ACE, provocou diminuição da produção de ovos, IGS elevado, gônadas apresentando folículos vitelogênicos grandes e elevado número de folículos atrésicos. Em conjunto esses efeitos

indicam falha na maturação final ovocitária, na desova e conseqüente retenção dos folículos nos ovários. As possíveis razões para esses resultados são a diminuição na produção de PGE₂, associados à elevada concentração de E₂ e seus receptores provocadas pela exposição crônica ao ACE. Em geral, fêmeas contaminadas por EDCs estrogênicos apresentam redução do IGS e menor quantidade de folículos maduros (BAHAMONDE *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2012). No entanto, peixes *Astyanax* expostos a múltiplos compostos estrogênicos apresentaram elevado IGS e ovários com maior número de folículos atrésicos e supermaturados, que são ovócitos envelhecidos não-ovulados devido a falha na maturação final (PRADO *et al.*, 2014; WEBER *et al.*, 2017). Em conjunto esses resultados demonstram os EDCs podem agir de diferentes formas na fisiologia gonadal dependendo do composto e da espécie em estudo, e que o ACE exerce nos ovários do zebrafish efeitos semelhantes aos de compostos estrogênicos.

Em relação aos machos, esse estudo aponta que a exposição crônica ao ACE resulta em menor quantidade de espermatogônias do tipo A indiferenciadas, devido a menor proliferação dessas células, possivelmente, provocada pelo aumento na concentração testicular de E₂ e redução de PGE₂, 11-KT e seus receptores, fatores importantes para proliferação desse tipo celular e maturação final dos espermatozoides (CRESPO *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2017b; RIOS *et al.*, 2016). Conseqüentemente, houve menor produção de espermatozoides e diminuição da qualidade espermática. Esses resultados se assemelham a reportados em peixes expostos a compostos estrogênicos (PASCHOALINI *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2021, 2023; WEBER *et al.*, 2019). No entanto, machos expostos ao ACE não apresentaram aumento nos níveis hepáticos de vitelogeninas, que é um clássico biomarcador de contaminação por EDCs estrogênicos (BAHAMONDE *et al.*, 2015), resultado semelhante a outro estudo com zebrafish expostos a até 10 mg/L de ACE. Em conjunto esses resultados indicam que o ACE exerce efeitos estrogênicos nos testículos, mas não possui esse efeito no fígado do zebrafish, o que sugere baixo poder estrogênico do ACE.

Na segunda etapa do projeto, foi realizada a avaliação dos efeitos da exposição crônica ao ACE de uma geração parental em sua prole F1 e F2, sem que elas nunca tenham entrado em contato com o fármaco. Os efeitos foram notáveis no grupo de progenitores expostos a 50 µg/L de ACE, em que os resultados mostraram fêmeas da F1 com redução na produção de E₂, folículos vitelogênicos e ovos, ao passo que machos tiveram redução de 11-KT, produção de espermatozoides e qualidade espermática, resultando em baixa taxa de fertilização e subfertilidade no zebrafish. Na geração F2, os resultados mostram efeitos similares nas fêmeas,

mas com machos apresentando parâmetros reprodutivos normais. Há uma enorme carência de estudos dos efeitos trans e multigeracionais do ACE na reprodução de peixes e outros vertebrados. No entanto, efeitos similares foram observados em ratos fêmeas e machos expostos ao ACE durante a gestação (DEAN *et al.*, 2016), o que sugere haver um mecanismo comum de interferência do ACE na gametogênese das gerações pós-exposição. Neste estudo também foi investigado a quantidade de DNA metilado nas gônadas na geração F0 exposta ao ACE e os resultados mostraram hipometilação do DNA após a exposição crônica ao fármaco. Uma vez que os gametas da F0 e F1 não tiveram contato direto com o ACE na água e a F2 apresentou diminuição na atividade reprodutiva das fêmeas, ocorreu efeitos transgeracionais. É possível que as características que determinam os efeitos apresentados na F1 e F2, tenham sido herdadas epigeneticamente, já que o padrão de metilação do DNA das gônadas da F0 foi alterado, e esses padrões podem estar presentes nos gametas e transmitidos para gerações futuras (OZANNE; CONSTÂNCIA, 2007). No entanto, os mecanismos moleculares detalhados subjacentes às modificações epigenéticas que as ligam a alterações reprodutivas na prole ainda não foram esclarecidos. Sabe-se que modificações epigenéticas compreendem também modificações de histonas e RNAs não-codificantes (KAMSTRA *et al.*, 2015), que não foram avaliados nesse trabalho, portanto não se exclui a possibilidade de o ACE provocar alterações epigenéticas por essas vias.

Este trabalho demonstrou que a exposição crônica a produtos farmacêuticos como o ACE, que são frequentemente encontrados em baixas concentrações no ambiente, é capaz de alterar parâmetros reprodutivos importantes dos peixes em mais de uma geração. Por serem uma classe de contaminantes ainda negligenciadas pelas organizações públicas de saúde e meio ambiente, os riscos da contaminação por ACE na ictiofauna local são iminentes. Além disso, avaliações multi e/ou transgeracionais como as realizadas nesse estudo são elementos-chave para determinar a magnitude dos efeitos adversos da contínua exposição de poluentes emergentes nas populações dos organismos aquáticos.

CONCLUSÕES

- A exposição crônica ao ACE é capaz de afetar a reprodução e fertilidade do zebrafish exercendo efeitos estrogênicos sobre a gametogênese;
- Machos e fêmeas apresentaram desbalanço na produção de E₂, 11-KT, PGE₂ e de seus receptores;
- O tratamento com ACE induz depleção de GSH, upregulation do mRNA das enzimas que metilam e downregulation das que desmetilam o DNA, acarretando hipometilação global do DNA das gônadas;
- A exposição crônica de uma geração parental ao ACE pode provocar alterações reprodutivas na prole (F1 e F2) mesmo ela nunca tendo contato com esse fármaco.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. *et al.* Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes. *Journal of Environmental Engineering*, v. 128, n. 3, p. 253–260, 2002.
- AKHTER, Afroza *et al.* Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. *Heliyon*, v. 4, n. 9, 2018.
- AKSU, E. H. *et al.* Mitigation of paracetamol-induced reproductive damage by chrysin in male rats via reducing oxidative stress. *Andrologia*, v. 48, n. 10, p. 1145–1154, 2016.
- AL-ANSARI, Ahmed M. *et al.* Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 β -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environmental Pollution*, v. 158, n. 8, p. 2566–2571, 2010.
- ANWAY, Matthew D. *et al.* Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, v. 308, n. 5727, p. 1466–1469, 2005.
- ANWAY, Matthew D.; LEATHERS, Charles; SKINNER, Michael K. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*, v. 147, n. 12, p. 5515–5523, 2006.
- AVDESH, Avdesh *et al.* Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory : An Introduction. n. November, 2012.
- AYOBAHAN, Steve U. *et al.* Detection of biomarkers to differentiate endocrine disruption from hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) using proteomics. *Chemosphere*, v. 240, p. 1–12, 2020.
- BAHAMONDE, P. A. *et al.* Whole organism responses and intersex severity in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part A. *Aquatic Toxicology*, v. 159, p. 290–301, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.023>>.
- BANIHANI, S A. Effect of paracetamol on semen quality. *Andrologia*, v. 1, n. May, p. 1–4, 2017.
- BAUMANN, Lisa *et al.* Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish

(Danio rerio)? *Chemosphere*, v. 238, p. 124589, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124589>>.

BOUND, Jonathan P.; VOULVOULIS, Nikolaos. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 12, p. 1705–1711, 2005.

CAMPANHA, Mariele B *et al.* A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. p. 7936–7947, 2015.

CAMPOS, Catarina; VALENTE, Luisa M.P.; FERNANDES, Jorge M.O. Molecular evolution of zebrafish *dnmt3* genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. *Gene*, v. 500, n. 1, p. 93–100, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.041>>.

CAPPARELLI, Mariana V. *et al.* Emerging Contaminants in the Northeast Andean Foothills of Amazonia: The Case of Study of the City of Tena, Napo, Ecuador. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 107, n. 1, p. 2–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-021-03275-8>>.

CHEN, Jiangfei *et al.* Reproductive toxicity of low level bisphenol A exposures in a two-generation zebrafish assay: Evidence of male-specific effects. *Aquatic Toxicology*, v. 169, p. 204–214, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.020>>.

COWIN, Prue A. *et al.* Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism. *Endocrinology*, v. 151, n. 2, p. 783–792, 2010.

CRESPO, Diego *et al.* PGE2 inhibits spermatogonia differentiation in zebrafish: interaction with Fsh and an androgen. *Journal of Endocrinology*, v. 244, n. 1, p. 163–175, 2020.

CROWDER, Camerron M.; LASSITER, Christopher S.; GORELICK, Daniel A. Nuclear Androgen Receptor Regulates Testes Organization and Oocyte Maturation in Zebrafish. *Endocrinology*, v. 159, n. 2, p. 980–993, 2018.

DAMSTRA, Terri *et al.* Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2*, p. 180, 2002.

- DEAN, Afshan *et al.* Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Scientific Reports*, n. January, p. 1–12, 2016.
- DRUMMOND, Cristina Delaerte *et al.* Postovulatory Follicle: A Model for Experimental Studies of Programmed Cell Death or Apoptosis in Teleosts. *Zoology*, n. 287, p. 176–182, 2000.
- DU, Kuo; RAMACHANDRAN, Anup; JAESCHKE, Hartmut. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*, v. 10, n. September, p. 148–156, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>>.
- FARRELL, Susan E. Acetaminophen Toxicity. *Journal for Nurse Practitioners*, v. 3, n. 3, p. 186–188, 2021.
- FEINBERG, Andrew P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, v. 447, n. 7143, p. 433–440, 2007.
- FICK, Jerker *et al.* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment CONTAMINATION OF SURFACE, GROUND, AND DRINKING WATER FROM PHARMACEUTICAL PRODUCTION. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, v. 28, n. 12, p. 2522–2527, 2009.
- FLINT, Shelby *et al.* Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, v. 104, p. 19–34, 2012.
- GALUS, Michal; KIRISCHIAN, Nina; *et al.* Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p. 200–211, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>>.
- GALUS, Michal; KIRISCHIAN, Nina; *et al.* Chronic , low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p. 200–211, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>>.
- GALUS, Michal; JEYARANJAAN, Judy; *et al.* Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132–133, p. 212–222, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.016>>.

- GATIDOU, Georgia *et al.* Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1138, n. 1–2, p. 32–41, 2007.
- GE, Liang *et al.* TET2 Plays an Essential Role in Erythropoiesis by Regulating Lineage-Specific Genes via DNA Oxidative Demethylation in a Zebrafish Model. *Molecular and Cellular Biology*, v. 34, n. 6, p. 989–1002, 2014.
- GERVIN, Kristina *et al.* Long-term prenatal exposure to paracetamol is associated with DNA methylation differences in children diagnosed with ADHD. *Clinical Epigenetics*, v. 9, n. 77, p. 1–9, 2017.
- GOLL, Mary; HALPERN, Marnie. DNA Methylation in Zebrafish. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 79, n. 2, p. 211–227, 2015.
- GOLSHAN, M.; ALAVI, Sayyed Mohammad Hadi. Androgen signaling in male fishes: Examples of anti-androgenic chemicals that cause reproductive disorders. *Theriogenology*, v. 139, p. 58–71, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.020>>.
- GÓMEZ, M. J. *et al.* Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, v. 66, n. 6, p. 993–1002, 2007.
- GONZÁLEZ-ROJO, S. *et al.* Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, v. 248, p. 368–379, 2019.
- GOODHEAD, R M; TYLER, C R. Endocrine-Disrupting Chemicals and Their Environmental Impacts. *Organic Pollutants*. [S.l.]: CRC Press, 2008. p. 265–292.
- GOTTLIEB, C. *et al.* Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphate content. *Fertility and Sterility*, v. 49, n. 2, p. 322–327, 1988. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59723-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59723-4)>.
- GUILOSKI, Izonete *et al.* Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 53, n. May, p. 111–120, 2017.

HOO, Jing Ying *et al.* Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. *BioMed Research International*, v. 2016, 2016.

HUTCHINSON, Thomas H. *et al.* Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n. SUPPL.1, p. 106–114, 2006.

JOZWIAK-BEBENISTA, Marta; NOWAK, Jerzy Z. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 71, n. 1, p. 11–23, 2014.

KAMSTRA, Jorke H. *et al.* Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 21, p. 16262–16276, 2015.

KOÇ, Nazan Deniz; AYTEKIN, Yener; YÜCE, Rikap. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 3, p. 513–522, 2008.

KWONG, Raymond W. M. *et al.* Uptake, elimination, and biotransformation of aqueous and dietary DDT in marine fish. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, v. 27, n. 10, p. 2053–2063, 2008.

LAU, Stephanie M.; MCGUIRE, Treasure M.; VAN DRIEL, Mieke L. Consumer concerns about paracetamol: A retrospective analysis of a medicines call centre. *BMJ Open*, v. 6, n. 6, p. 1–8, 2016.

LEE, Duk-hee; JR, David R Jacobs; PORTA, Miquel. Commentary Hypothesis : a Unifying Mechanism for Nutrition and Chemicals as Lifelong Modulators of DNA Hypomethylation. *Environmental Health Perspectives*, v. 117, n. 12, p. 1799–1802, 2009.

LEGRAND, A *et al.* Paracetamol , aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human Reproduction*, v. 28, n. 7, p. 1890–1898, 2013.

LIU, Yan *et al.* Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 130, p. 124–132, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.012>>.

LUBZENS, Esther *et al.* Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>>.

LV, Xuemin *et al.* Occurrence and removal of phenolic endocrine disrupting chemicals in the water treatment processes. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 22860, 2016.

MORAIS, R. D.V.S. *et al.* Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 454, p. 112–124, 2017a.

MORAIS, R. D.V.S. *et al.* Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 454, p. 112–124, 2017b.

MOREIRA, Davidson Peruci *et al.* Exposure to acetaminophen impairs gametogenesis and fertility in zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Toxicology*, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-022-03390-3>>.

MORTHORST, Jane E. *et al.* Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 157, n. 2, p. 251–257, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.12.001>>.

NELSON, Erik R.; HABIBI, Hamid R. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, v. 192, p. 15–24, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032>>.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 197–206, 2009.

OVERTURF, Matthew D. *et al.* Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 45, n. 6, p. 469–491, 2015.

OZANNE, Susan E.; CONSTÂNCIA, Miguel. Mechanisms of Disease: The developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nature Clinical Practice Endocrinology and*

Metabolism, v. 3, n. 7, p. 539–546, 2007.

PASCHOALINI, Alessandro Loureiro *et al.* Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 47, n. 4, p. 797–810, 2021.

PEREIRA, Marina Rangel Ferro *et al.* Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring? *Reproductive Toxicology*, v. 93, n. January, p. 68–74, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.12.007>>.

POLEO, G. A. *et al.* Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 961–966, 2001.

PORTA, Miquel *et al.* Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: The international experience. *Environment International*, v. 34, n. 4, p. 546–561, 2008.

PRADO, Paula S. *et al.* Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environmental Research*, v. 131, p. 165–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.002>>.

PRZYBYŁA, Grzegorz W.; SZYCHOWSKI, Konrad A.; GMIŃSKI, Jan. Paracetamol – An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 48, n. 1, p. 3–19, 2021.

QIE, Yu *et al.* Environmental Estrogens and Their Biological Effects through GPER Mediated Signal Pathways. *Environmental Pollution*, v. 278, p. 116826, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116826>>.

RIBEIRO, Yves Moreira *et al.* Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 224, n. April, 2021.

RIBEIRO, Yves Moreira *et al.* Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and sperm quality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 98, n. June 2022, 2023.

- RIESCO, Marta F.; ROBLES, Vanesa. Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. 1–9, 2013.
- RIOS, Mariana *et al.* Low physiological levels of prostaglandins E2 and F2 α improve human sperm functions. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 4, p. 434–439, 2016.
- ROBAIRE, Bernard *et al.* A cross-species comparative approach to assessing multi- and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals. *Environmental Research*, v. 204, 2022.
- SANTOS, H. B. *et al.* Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology*, v. 67, n. 5, p. 1446–1459, 2005.
- SCHULZ, Rüdiger W. *et al.* Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.
- SCOTT, Graham R.; SLOMAN, Katherine A. *The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. Aquatic Toxicology*. [S.l: s.n.], 2004
- SHARMA, Chhatra Mani *et al.* Bioaccumulation of organochlorine pollutants in the fish community in Lake Årungen, Norway. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 8–9, p. 2452–2458, 2009.
- SHIMODA, Nobuyoshi *et al.* Identification of a gene required for de novo DNA methylation of the zebrafish no tail gene. *Developmental Dynamics*, v. 233, n. 4, p. 1509–1516, 2005.
- SILVA, Paula *et al.* Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads-A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquatic Toxicology*, v. 124–125, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.002>>.
- SMITH, Chelsea M.; VERA, Madeline K.M.; BHANDARI, Ramji K. Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, v. 210, n. March, p. 215–226, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005>>.

SONG, Xiaohong; WANG, Xuegeng; BHANDARI, Ramji K. Developmental abnormalities and epigenetic alterations in medaka (*Oryzias latipes*) embryos induced by triclosan exposure. *Chemosphere*, v. 261, p. 127613, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127613>>.

TAKAHASHI, Takayuki; HAGIWARA, Akane; OGIWARA, Katsueki. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 461, p. 236–247, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.019>>.

TANG, Haipei *et al.* Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Scientific Reports*, v. 6, n. December 2015, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep28545>>.

TAYLOR, Sean C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>>.

VLIEGENTHART, A D Bastiaan *et al.* Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *British journal of clinical pharmacology*, v. 78, n. 6, p. 1217–1227, 2014.

WEBER, André Alberto *et al.* Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 279, n. December 2018, p. 99–108, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.016>>.

WEBER, André Alberto *et al.* Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 592, p. 693–703, 2017.

ZEMACH, Assaf *et al.* Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, v. 328, n. 5980, p. 916–919, 2010.

ZHANG, Xiaoning *et al.* 2,4-Dichlorophenol induces global DNA hypermethylation through the increase of S-adenosylmethionine and the upregulation of DNMTs mRNA in the liver of goldfish *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 160, n. 1, p. 54–59, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.11.008>>.

ZHENG, Qiaoyuan *et al.* Loss of Cyp11c1 causes delayed spermatogenesis due to the absence of 11-ketotestosterone. *Journal of Endocrinology*, v. 244, n. 3, p. 487–499, 2020.

ŻUR, Joanna *et al.* Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 21498–21524, 2018.