

TESIS DOCTORAL



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



Disruptores endocrinos y células osteoblásticas. Efecto de los bisfenoles.

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Directoras:

Concepción Ruiz Rodríguez

M^a Elvira de Luna Bertos

Enrique García Recio

Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Enrique García Recio
ISBN: 978-84-1117-000-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84461>

ÍNDICE

RESUMEN	7
MARCO TEÓRICO.....	11
1. EL TEJIDO ÓSEO	11
1.1 COMPONENTE CELULAR	11
1.1.1 El osteoblasto	12
1.1.1.1 Ontogenia del osteoblasto	12
1.1.1.2 Diferenciación.....	13
1.1.1.3 Identificación	14
1.1.1.3.1 Identificación morfológica.....	14
1.1.1.3.2 Identificación bioquímica	14
1.1.1.3.3 Identificación antigénica	15
1.1.1.3.4 Identificación génica.....	16
1.1.1.4 Funciones del osteoblasto.....	17
1.1.1.4.1 Síntesis de la matriz ósea	17
1.1.1.4.2 Regulación de la osteoclastogénesis.....	17
1.1.1.4.3 Funciones endocrinas.....	18
1.1.1.4.4 Otras funciones del osteoblasto	18
1.1.2 Osteocitos.....	18
1.1.3 Osteoclastos	19
1.2 MATRIZ ÓSEA	19
1.2.1 Matriz inorgánica.....	19
1.2.2 Matriz orgánica.....	20
1.2.3 Colágeno	20
1.2.4 Proteínas no colágenas	20
1.2.5 Proteoglicanos	21
1.2.6 Factores de crecimiento.....	21
1.3 REMODELADO ÓSEO	21
2. DISRUPTORES ENDOCRINOS.....	24
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	24
2.2 CLASIFICACIÓN Y CRITERIOS DEFINITORIOS.....	25

2.3	LEGISLACIÓN	26
2.4	DIFUSIÓN Y EXPOSICIÓN	27
3.	BISFENOLES	29
3.1	BISFENOL A.....	29
3.1.1	Antecedentes.....	29
3.1.2	Características físico-químicas	29
3.1.3	Propiedades industriales	29
3.1.4	Exposición humana al BPA	30
3.1.5	Efectos sobre la salud.....	31
3.1.6	Regulación normativa.....	32
3.1.7	Análogos	33
3.2	BISFENOL S	33
3.3	BISFENOL F	34
3.4	BISFENOL AF	35
	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>38</u>
	<u>JUSTIFICACIÓN.....</u>	<u>55</u>
	<u>HIPÓTESIS</u>	<u>56</u>
	<u>OBJETIVOS</u>	<u>57</u>
	OBJETIVO GENERAL.....	57
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>58</u>
	OBJETIVO 1	58
	ABSTRACT	58
	1. INTRODUCTION	59
	2. RESULTS	60
	2.1 Effect of BPA on Growth and Cellular Viability	60
	2.2 Effect off BPA on Antigenic Profile.....	61
	2.3 Effect of BPA on ALP Synthesis	62

2.4 Effect of BPA on In Vitro Mineralization	62
2.5 Effect of BPA on Phagocytic Capacity	63
2.6 Effect of BPA on Gene Expression.....	63
3. DISCUSSION	64
4. MATERIALS AND METHODS	66
4.1. Chemical	66
4.2. Primary Human Osteoblasts	66
4.3. Treatments	66
4.4. Cell Proliferation.....	67
4.5. Apoptosis and Necrosis Analysis.....	67
4.6. Antigenic Phenotype	67
4.7. ALP Activity	68
4.8. Mineralization Assay	68
4.9. Phagocytic Activity	69
4.10. Gene Expression Analysis.....	69
4.11. Statistical Analysis	70
5. CONCLUSIONS	71
6. REFERENCES.....	71
OBJETIVO 2	76
ABSTRACT	76
1. INTRODUCTION	76
2. MATERIAL AND METHODS	78
2.1. Chemical	78
2.2 Primary Human Osteoblasts	78
2.3 Treatments	78
2.4 Cell Proliferation Assay.....	78
2.5 Apoptosis and necrosis analysis.....	79
2.6 ALP Activity	79
2.7 Mineralization Assay	79
3. RESULTS	80
3.1 Effect of BPF, BPS, and BPAF on osteoblast growth.	80
3.2 Effect of BPF, BPS, and BPAF on the synthesis of alkaline phosphate.....	81
3.3 Effect of BPF, BPS, and BPAF on mineralization in vitro.	82
4. DISCUSSION	82
5. REFERENCES.....	84

OBJETIVO 3	91
ABSTRACT	91
1. INTRODUCTION	92
2. RESULTS	93
2.1. RUNX2.....	93
2.2. BMP-2 and BMP-7	93
2.3. OSX.....	94
2.4. ALP	95
2.5. OSC	95
2.6. COL-1	96
3. DISCUSSION	96
4. MATERIAL AND METHODS.....	99
4.1. Chemicals.....	99
4.2. Isolated and primary culture of Human Osteoblasts	99
4.3. Treatments	100
4.4. Effect of BPF, BPS, and BPAF on the gene expression of human osteoblasts	100
4.5. Statistical Analysis	101
5. CONCLUSIONS	102
6. REFERENCES.....	102
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>108</u>
<u>ABREVIATURAS.....</u>	<u>108</u>

RESUMEN

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo altamente especializado que compone el esqueleto. Se caracteriza por tener una matriz extracelular rica en sales minerales, que le confieren una gran dureza y resistencia, además de fibras colágenas que le aportan elasticidad y flexibilidad. El tejido óseo está compuesto por diferentes poblaciones celulares tales como los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos, que participan en los procesos de formación y remodelado óseo. Este tejido está sometido a un proceso continuo de renovación que tiene lugar cíclicamente a lo largo de toda la vida. Del correcto equilibrio fisiológico entre ambos procesos dependerá el buen mantenimiento de la salud ósea. Por ello, cualquier factor o agente endógeno o exógeno que afecte tanto a la matriz extracelular como a alguna de estas poblaciones puede comprometer la salud ósea. Las enfermedades óseas, tales como la osteoporosis, pero también otras como la enfermedad periodontal o la artritis reumatoide, constituyen hoy una de las principales preocupaciones en cuanto a salud pública a nivel global.

El osteoblasto, la célula responsable de la formación y regeneración ósea puede ser objeto de caracterización atendiendo a parámetros morfológicos, antigénicos y funcionales. Entre sus funciones, además de la formación de la matriz ósea mediante la secreción de diversas moléculas implicadas en la misma (osteocalcina, proteínas morfogenéticas óseas o fosfatasa alcalina, entre otras), quizás la mejor conocida, podemos enumerar otras relacionadas con el sistema inmune, como la capacidad fagocítica, la síntesis de citoquinas o la expresión de moléculas propias de las células presentadoras de antígenos, como son los antígenos de superficie CD54, CD80 o CD86.

Los disruptores endocrinos (EDCs) son sustancias externas que alteran la función del sistema endocrino y causan efectos adversos en la salud relacionados con la infertilidad, la obesidad o la carcinogénesis. En este grupo de sustancias se incluyen diferentes compuestos de origen animal, vegetal y sintético, así como distintos residuos industriales. Estas sustancias son persistentes y se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente. La legislación europea considera a los EDCs como sustancias extremadamente

preocupantes y exhorta a los estados miembros a reducir su uso y reemplazarlos por alternativas más seguras.

Se estima que alrededor de 1000 sustancias químicas antropogénicas pueden tener actividad endocrina, entre las cuales podemos reseñar por su extensa presencia los ftalatos, bisfenoles, parabenos, entre otros. Estos compuestos se encuentran en productos cotidianos como latas de conserva, plásticos, detergentes, tickets de papel térmico, etc.

En concreto, los bisfenoles (BPs) han recibido mucha atención debido a su amplia presencia en productos de consumo y su capacidad para alterar procesos fisiológicos esenciales. Su similitud estructural con los estrógenos les permite interferir con las mismas vías de señalización endocrinas con las que estos interactúan.

El bisfenol A (BPA) es un compuesto orgánico utilizado en la producción de resinas fenólicas, poliacrilatos y poliésteres, resinas epoxi y policarbonato. Se encuentra en una amplia variedad de productos, como botellas de agua, biberones, productos médicos, etc. El BPA se une a los receptores de estrógeno ejerciendo efectos agonistas y antagonistas. Los efectos del BPA en el organismo incluyen alteraciones en el metabolismo, neurodesarrollo, fertilidad, salud cardiovascular y aumento del riesgo de ciertos tipos de cáncer.

Debido a sus efectos nocivos, se han implementado regulaciones para reducir su uso en productos destinados al contacto con alimentos y bebidas. Sin embargo, en sustitución de este BP, se han diseñado otros compuestos análogos como el bisfenol S, el bisfenol F o el bisfenol AF, entre otros. No obstante, existe controversia sobre la posibilidad de que causen efectos similares al BPA.

Estudios realizados en células de origen murino sugieren que el BPA podría modular la densidad mineral ósea alterando el normal funcionamiento del osteoblasto, a través de la inhibición de distintos factores de transcripción o proteínas morfogenéticas óseas.

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue analizar el efecto de algunos bisfenoles (bisfenol A, bisfenol S, bisfenol F y bisfenol AF) sobre la fisiología del osteoblasto, utilizando para ello cultivos primarios de osteoblastos humanos.

Los osteoblastos humanos fueron tratados con los bisfenoles mencionados durante 24 horas, a la dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. El estudio de la proliferación celular se realizó mediante la técnica del MTT y se analizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm. La inducción de apoptosis/necrosis se estudió mediante la marcación celular con anexina V y yoduro de propidio y se analizó usando un citómetro de flujo con láser de argón a una longitud de onda de 488 nm. La determinación del efecto sobre el perfil antigénico de los osteoblastos se llevó a cabo mediante citometría de flujo y con el uso de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos. La actividad fosfatasa alcalina fue cuantificada mediante una técnica espectrofotométrica a una longitud de onda de 405 nm. El estudio de la mineralización se llevó a cabo a los 7, 14 y 21 días mediante la técnica de la alizarina roja, y se cuantificó mediante espectrofotometría a 562 nm. La actividad fagocítica fue evaluada utilizando marcación directa mediante el uso de bolitas de látex fluorescentes como partículas diana y cuantificada mediante citometría de flujo. La expresión genética de proteínas por el osteoblasto fue estudiada mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (o RT-PCR) seguida de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR).

A partir de los resultados de este trabajo se evidenció que el bisfenol A reduce la proliferación y retrasa la maduración celular *in vitro* de los osteoblastos humanos en cultivo, disminuyendo la actividad fosfatasa alcalina, incrementando la expresión de CD54 y CD80 y disminuyendo la mineralización. Esto se correlaciona con una reducción en la expresión génica de los marcadores osteogénicos ALP, Col-1, OSC, OSX, Runx2, BMP-2 y BMP-7. La capacidad fagocítica también se ve mermada. Por su parte, los análogos del BPA redujeron la proliferación por una inducción de la apoptosis, a excepción del BPAF que no mostró efectos sobre la viabilidad celular. Todos redujeron la mineralización, así

como la expresión de marcadores osteogénicos ensayados. Los efectos observados se produjeron de manera dosis-dependiente.

Estos resultados sugieren que el BPA y sus análogos (BPS, BPF y BPAF) alteran los distintos parámetros estudiados en el osteoblasto, lo que supone un efecto adverso sobre esta población celular la cual desempeña un papel clave en la formación y reparación ósea. Esto a su vez podría modular la fisiología del tejido óseo causando así un impacto nocivo sobre la salud ósea.

MARCO TEÓRICO

1. EL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido conectivo mineralizado altamente dinámico que responde a estímulos fisiológicos, metabólicos, estrés funcional y otros cambios ambientales. Entre las funciones que lleva a cabo podemos citar la locomoción, el sostén y protección de otros órganos y tejidos blandos, servir como depósito de calcio y fósforo o dar albergue a la médula ósea ¹.

El proceso de remodelación ósea es altamente complejo y es fruto del equilibrio entre los continuos procesos de formación y resorción ósea. Dichos procesos son modulados por la conjunción de varios factores de índole local y sistémica, como la acción de algunas hormonas, citoquinas y quimiocinas, así como la estimulación biomecánica ^{2,3}.

A nivel histológico, el tejido óseo comprende un componente celular y una matriz extracelular calcificada que se constituye de fibras y sales de calcio y fósforo, responsables de las principales propiedades de este tejido ⁴.

1.1 Componente celular

Las células del tejido óseo constituyen en torno al 10 % del volumen total del hueso. Podemos establecer una clasificación según las funciones que realizan de manera especializada distinguiendo tres tipos: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas poblaciones celulares tienen su origen en dos linajes celulares diferentes: células madre mesenquimales (MSC), que se diferencian en células osteoprogenitoras y éstas a su vez en osteoblastos y osteocitos, y células madre hematopoyéticas de las que se originan los osteoclastos ^{3,4}.

1.1.1 El osteoblasto

Los osteoblastos se ubican en la región cortical del hueso y suponen entre 4-6 % de la población celular ósea^{5,6}. Su función es la síntesis y secreción de la matriz ósea o matriz osteoide. Son células mononucleares de aspecto fusiforme que poseen citoplasma basófilo del que emergen prolongaciones citoplasmáticas⁷. Presentan características morfológicas propias de las células con alta actividad biosintética, como un prominente retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi bastante desarrollado, así como vesículas secretoras y vacuolas cargadas con procolágeno y proteoglicanos⁵. Mientras están en fase activa, los osteoblastos muestran una forma redondeada u oval. Una vez desempeñada su función como célula formadora de hueso, el osteoblasto puede tener varios destinos: puede quedar inactivo perdiendo su capacidad sintética, aplanarse y transformarse en célula de revestimiento o *lining cell* cubriendo la superficie del hueso; puede continuar con el proceso de calcificación y convertirse en osteocito; o puede sufrir apoptosis^{8,9}.

1.1.1.1 Ontogenia del osteoblasto

Los osteoblastos tienen su origen en las MSC o células multipotentes. Las MSC tienen una capacidad de proliferación limitada y entran en proceso de senescencia tras un cierto número de divisiones cuando se reproducen en cultivo¹⁰. A partir de dichas MSC se forman células osteoprogenitoras que a su vez se diferenciarán en osteoblastos. Las células osteoprogenitoras se ubican en el periostio, el endostio y los canales de Havers, en el centro de las osteonas, donde permanecen en espera de estímulo para iniciar el proceso de proliferación y diferenciación. Algunos factores responsables de dicho proceso son las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento transformante β (TGF β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e interleuquinas (IL).

1.1.1.2 Diferenciación

La diferenciación de MSC en osteoblastos es un proceso altamente complejo que puede estudiarse en cuatro fases: 1. compromiso del linaje; 2. proliferación; 3. maduración de la matriz extracelular y 4. mineralización de la matriz⁴ (Figura 1).

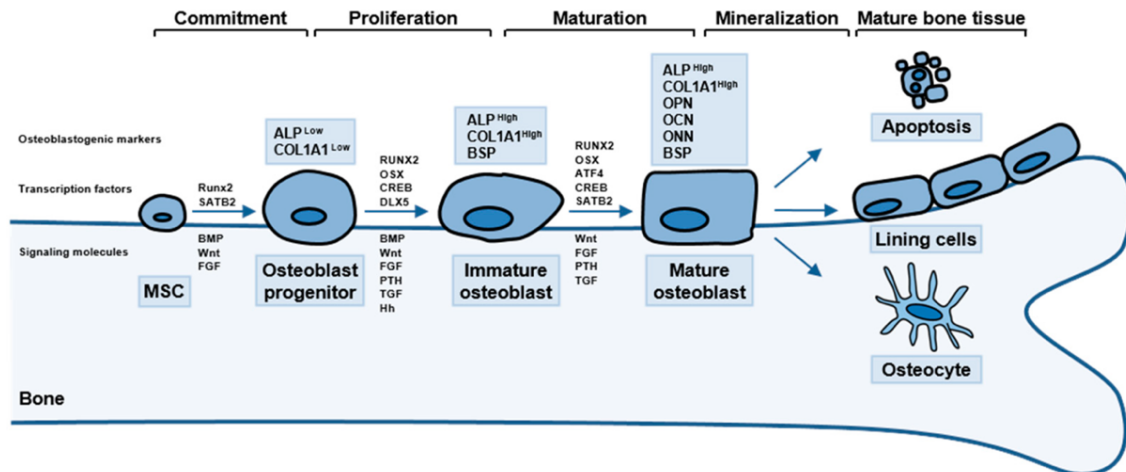


Fig. 1: Diferenciación del osteoblasto (Amarasekara *et al*, 2021)¹¹.

El paso de una fase a otra está condicionado por la expresión de genes y factores específicos que regulan este proceso. Así, durante la primera fase, el inicio de la diferenciación de MSC a osteoprogenitores está condicionado por la expresión de BMP y de las proteínas relacionadas con la vía de señalización Wnt. En la segunda fase, los osteoprogenitores expresan el factor de transcripción Runx2 y colágeno tipo 1 (Col-1). En la tercera fase, y debido a la acción de hormona paratiroidea (PTH), se produce la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), y sialoproteína ósea II, (BSP-II), además de continuar la síntesis de Col-1, induciendo todo ello la diferenciación del osteoprogenitor hacia la célula pre-osteoblástica. En la última etapa se produce el paso de pre-osteoblasto a osteoblasto maduro debido a la influencia de IGF-1 y la prostaglandina E2 (PGE2). Los osteoblastos maduros expresan osteocalcina (OSC), colagenasas y BSP-I y BSP-II. A toda esta batería de factores implicados se añade la acción de otros reguladores como: neurotransmisores, hormonas (PTH, insulina), vitaminas (calcifediol), factores de crecimiento (BMP, IGF y FGF), factores de transcripción, citoquinas (IL-1, IL-6, IL-11) e incluso la presión mecánica^{2,8,12,13}.

1.1.1.3 Identificación

La identificación del osteoblasto se lleva a cabo atendiendo a sus parámetros morfológicos, bioquímicos, antigénicos y genéticos.

1.1.1.3.1 Identificación morfológica

El osteoblasto activo tiene forma cúbica con un núcleo ubicado excéntricamente, citoplasma de color azulado y un halo perinuclear. Los osteoblastos contactan con sus osteoblastos vecinos a través de prolongaciones citoplasmáticas. Cuando las células comienzan a proliferar, adquieren una morfología fusiforme. Además, los osteoblastos presentan un aparato de Golgi bien desarrollado, numerosas mitocondrias y un voluminoso retículo endoplasmático, característica propia de células con alta actividad biosintética. También hay presentes en su interior proteínas del citoesqueleto relacionadas con la morfología de la célula, así como con la movilidad y la unión celular ^{7,14}.

1.1.1.3.2 Identificación bioquímica

Los osteoblastos son capaces de secretar proteínas colágenas y no colágenas. Las proteínas no colágenas incluyen proteoglicanos, proteínas glicosiladas y proteínas γ -carboxiladas. Estas proteínas ejercen funciones muy diversas que van desde la regulación del depósito y el recambio mineral óseo hasta la regulación de la actividad celular ⁵.

La OSC representa el 15 % de las proteínas no colágenas de la matriz ósea y es sintetizada por los osteoblastos ¹⁵. Dado que la concentración de OSC aumenta tanto por la actividad sintética de los osteoblastos como por la acción digestiva de los osteoclastos sobre la matriz, actualmente es considerada un marcador de recambio óseo en lugar de un marcador específico de formación ósea ^{5,15,16}.

La principal glucoproteína útil para la caracterización bioquímica del osteoblasto es la ALP. Podemos encontrar esta enzima tanto unida a la superficie de los osteoblastos,

como libre en el interior de la matriz mineralizada. La actividad de ALP propicia el aumento de la concentración y posterior fijación de calcio y fosfato durante el proceso de mineralización ósea ⁷.

Los osteoblastos maduros también producen reguladores de la mineralización de la matriz, como son las proteínas no colágenas osteopontina (OPN) y BSP, además del ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B, más conocido como RANKL ¹², que es necesario para la diferenciación de los osteoclastos ^{8,17,18}.

La OPN es producida por los osteoblastos en diversas etapas de su ciclo vital ¹⁹, por los osteocitos y también por los osteoclastos²⁰. Ejerce tres funciones en el tejido óseo, que son la regulación de la adhesión celular; la regulación de la función osteoclástica y la regulación de la mineralización ^{16,19-22}.

El colágeno constituye una familia de proteínas presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivos. Está constituido por tres cadenas α dispuestas en una estructura de triple hélice ²³. El Col-1 representa en torno al 95 % del contenido total de colágeno del hueso y en torno al 80 % del total de proteínas de dicho tejido. El osteoblasto produce esta proteína al final de la fase de proliferación e inicio de la fase de maduración de la matriz ósea ²⁴.

1.1.1.3.3 Identificación antigénica

Los osteoblastos presentan un perfil antigénico específico que facilita su identificación ²⁵.

El CD10 es una glicoproteína de membrana ampliamente distribuida en los tejidos animales implicada en la hidrólisis de polipéptidos inflamatorios y vasoactiva ²⁶. El CD10 se expresa en monocitos, macrófagos, granulocitos y linfocitos B, entre otros ²⁷⁻²⁹. Este antígeno de superficie también puede ser identificado en células osteoblásticas ^{25,30-32}.

El CD44 es una glicoproteína de superficie implicada en una amplia variedad de actividades fisiológicas, como la adhesión celular, la hematopoyesis, la modificación tisular, la transición epitelio-mesenquimal en células multipotenciales, así como en células

metastásicas, entre otras ³³⁻³⁵. Su expresión está relacionada con la vía de señalización Wnt/ β -catenina, especialmente relevante en la osteogénesis ³⁶.

Asimismo, los osteoblastos expresan CD54, CD80, CD86 y HLA-DR, marcadores propios de células presentadoras de antígenos y activadoras de linfocitos T. Este hecho refuerza la hipótesis de la relación existente entre el sistema inmune y el tejido óseo ³⁷.

La expresión de estos marcadores no es constante, sino que puede verse modificada en función del grado de maduración celular o por la presencia de citoquinas y factores de crecimiento, como ocurre con CD54, CD80, CD86 y HLA-DR. Esto hace pensar que existe un *pool* de antígenos cuya expresión es modulable en contraposición a otro grupo de antígenos constitutivos cuya expresión se mantiene más o menos constante ^{32,38-41}.

1.1.1.3.4 Identificación génica

La osteogénesis es un proceso mediado por múltiples factores externos que activan la expresión de proteínas de señalización específicas de los osteoblastos y los factores de transcripción implicados en su diferenciación. Uno de los más relevantes es Runx2, que en el osteoblasto se une a una región específica del núcleo activando la síntesis de OSC ⁴². Este factor de transcripción se expresa en todos los osteoblastos y su expresión está limitada a estructuras esqueléticas, no siendo expresado por los tejidos blandos. El déficit de Runx2 se asocia con malformaciones óseas debido a una detención en el proceso madurativo de los osteoblastos, como ocurre en la disostosis cleidocraneal ⁴³⁻⁴⁵. No se conoce con certeza el mecanismo por el que se regula la expresión de Runx2, aunque parece ser que el TGF β , BMP-2 y BMP-7 regulan positivamente su expresión ⁴⁶.

Además de OSC y Runx2, existe una serie de proteínas propias del proceso de diferenciación. Runx2 potencia la expresión de osterix (OSX), un factor de transcripción esencial para el compromiso y diferenciación de las MSC hacia el osteoblasto maduro. OSX además, induce la expresión de ALP, OPN, BSP y Col-1 ¹¹. ALP y OSC se expresan en torno al día 14 tras el inicio de la diferenciación de MSC. Entre los días 14 y 21, el Col-1 se va expresando de manera creciente. El CD44, Runx2 y PTH se expresan de manera constante

durante todo el proceso de maduración ⁴⁷. La BSP y la OPN, ambas proteínas propias de la matriz ósea, son consideradas marcadores de maduración osteoblástica tardía ^{11,48}.

1.1.1.4 Funciones del osteoblasto

1.1.1.4.1 Síntesis de la matriz ósea

La principal función del osteoblasto es la formación de la matriz ósea y la regulación de la mineralización de la misma ⁴⁹. La formación de la matriz orgánica está mediada por la secreción de diversas moléculas como son proteínas colágenas (principalmente Col I), proteínas no colágenas (OSC, OSN, BSP II y OPN) y proteoglicanos (decorina y biglicano). Una vez se ha conformado la matriz osteoide, se inicia el proceso de mineralización, que concluye con la formación de cristales de hidroxiapatita confirmando al hueso su rigidez y resistencia ⁴⁹⁻⁵¹.

1.1.1.4.2 Regulación de la osteoclastogénesis

Para el mantenimiento de una buena salud ósea es preciso que exista un equilibrio constante entre el proceso de formación ósea y el proceso de resorción. Dicho balance está influenciado por la acción de estímulos hormonales, químicos y sistémicos. No obstante, también es precisa una adecuada coordinación entre las respectivas poblaciones celulares responsables de ambos procesos ^{17,52,53}.

La regulación de la osteoclastogénesis tiene lugar debido a la acción paracrina de los osteoblastos, que influye sobre la actividad osteoclástica mediante la acción de diversas citoquinas. El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos actúa sobre los pre-osteoclastos, promoviendo su proliferación y diferenciación ⁵⁴. La acción del RANKL, sintetizado por los osteoblastos, sobre su receptor, que es sintetizado por los pre-osteoclastos, induce la maduración de esta población celular ⁵⁵.

1.1.1.4.3 Funciones endocrinas

El hueso puede comportarse como un órgano endocrino gracias a la secreción de moléculas que ejercen actividad hormonal, como la FGF23, sintetizada por los osteocitos e implicada en la homeostasis del fosfato ⁵⁶. La OSC, además de las funciones previamente expuestas, cuando se encuentra en su forma infracarboxilada ejerce actividad endocrina, mostrando una alta afinidad por el páncreas y el tejido adiposo. En concreto, cuando actúa sobre el páncreas, es capaz de influir sobre el metabolismo de la insulina y la glucemia ^{57,57-59}.

1.1.1.4.4 Otras funciones del osteoblasto

A las funciones previamente descritas debemos añadir algunas relacionadas con el sistema inmune, como son la capacidad fagocítica, la estimulación de linfocitos T o la síntesis de citoquinas ⁶⁰⁻⁶².

1.1.2 Osteocitos

Los osteocitos son la población celular más abundante del tejido óseo, suponiendo un 90-95% del mismo ⁶³. Tienen su origen ontogénico en MSC previa diferenciación a osteoblasto y posteriormente a osteocito. Los osteocitos se encuentran incrustados en la matriz ósea y presentan una morfología dendrítica formando una extensa red que permite la comunicación intercelular ⁶⁴.

Los osteocitos están directamente implicados en la sensibilidad mecánica. Poseen la capacidad de traducir los estímulos mecánicos en actividad biológica por un efecto piezoeléctrico mediante mecanismos que implican moléculas como PGE2, ciclooxigenasa-2, Runx2 u óxido nítrico ^{65,66}. Además, los osteocitos actúan sobre la homeostasis del calcio, pudiendo incluso inducir la resorción del hueso por acción de la PTH ⁴.

1.1.3 Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas que se originan a partir de células mononucleares del linaje de células madre hematopoyéticas⁶⁷, y cuya diferenciación es estimulada por la acción de varias citoquinas como el M-CSF, secretado por osteoprogenitores y osteoblastos, y el RANKL, secretado por osteoblastos y osteocitos y células estromales⁶⁸⁻⁷⁰. La regulación de su actividad está mediada por la acción de varios factores y citoquinas como RANKL, OPG, IL-1, IL-6, PTH, 1,25-dihidroxitamina D y calcitonina^{4,67,69}. Estos factores promueven la activación de factores de transcripción y la expresión génica en los osteoclastos^{55,70}.

Durante el remodelado óseo, los osteoclastos producen la fase de resorción⁷¹. Esta degradación del tejido óseo se produce en dos fases: en primer lugar, los osteoclastos liberan hidrogeniones al medio extracelular que acidifican el área a destruir y, posteriormente, liberan catepsina K que digiere la fracción proteica de la matriz, compuesta principalmente de Col-1^{67,72,73}.

1.2 Matriz ósea

La matriz ósea representa el 90 % del volumen total de hueso. Se compone de una matriz mineral o inorgánica (70 %), una matriz orgánica (20 %), lípidos (< 3 %) y agua (5-10 %). Estos elementos se combinan formando una estructura que dota al hueso de la rigidez y resistencia propias de este tejido⁶⁸.

1.2.1 Matriz inorgánica

El componente mineral del hueso representa el 65 % de la masa ósea. Se compone principalmente de calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) que se combinan formando cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. En menor medida encontramos sodio, potasio, magnesio, manganeso, flúor, zinc, citrato, bario y estroncio^{3,74}. Esta composición otorga al hueso su resistencia mecánica.

1.2.2 Matriz orgánica

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio de la masa ósea. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el Col-1 (90 %). La matriz orgánica juega un papel crucial en la fisiología ósea, lo cual se hace patente ante patologías asociadas al colágeno como la osteogénesis imperfecta ⁷². La matriz orgánica se compone de proteínas colágenas, proteínas no colágenas, factores de crecimiento y proteoglicanos ⁷⁵.

1.2.3 Colágeno

El 90 % de la matriz está constituida por colágeno ⁷⁶. El colágeno es una proteína constituida por tres cadenas polipeptídicas alfa, que se unen mediante puentes de hidrógeno formando una estructura en α hélice ²³. El Col-1 proporciona algunas de las características mecánicas del hueso, su elasticidad y tenacidad ⁷⁶. No tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

Además de colágeno, la matriz orgánica se compone de proteínas no colágenas, proteoglicanos y factores de crecimiento.

1.2.4 Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas intervienen en la conformación del hueso y en la mineralización de la matriz, al promover el depósito de minerales para la formación de los cristales de hidroxapatita. La mayor parte son glicoproteínas tales como la OSC, OPN, BSP, fibronectina, fosfoproteínas, trombospondina, entre otras ⁷².

La OSC es una pequeña proteína gamma carboxilada de la matriz sintetizada por osteoblastos y plaquetas. El ácido γ -carboxi-glutámico es un aminoácido que se une al calcio y que precisa de la presencia de vitamina K para su síntesis. La OSC supone el 15 % de las proteínas no colágenas. Su principal función es la de promover la síntesis de la matriz ²¹.

Sus niveles plasmáticos se consideran como uno de los marcadores bioquímicos del recambio óseo.

Son también glicoproteínas las proteínas llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein): la OPN, fibronectina, la trombospondina, vitronectina y la BSP, implicadas en la adhesión celular a la matriz. Ejercen un rol en la regulación de la formación de cristales de hidroxapatita y, además, son indispensables para la correcta actividad de las células destructoras del tejido óseo, pues actúan de anclaje entre los osteoclastos y la matriz ósea ^{19,22,72}. La BSP es capaz de inducir la nucleación de cristales de hidroxapatita. Además, puede unirse al colágeno potenciando la calcificación de la matriz ⁷⁷.

1.2.5 Proteoglicanos

Constituyen el 10 % de las proteínas no colágenas. Destacan el hialuronano y condroitín sulfato, que actúan en los albores de la morfogénesis ósea, y el biglicano y decorina, más característicos de la fase final del proceso de formación ⁷⁸.

1.2.6 Factores de crecimiento

Son las BMP, la familia del TGF β , IL-1, IL-6, IGF, PDGF, entre otros ⁷⁹. Intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células del tejido óseo.

1.3 Remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico que está sometido de manera permanente y continua a un proceso de remodelación. Dicho proceso es el resultado de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos respectivamente ⁸⁰. Para su estudio puede ser dividido en tres fases: fase de resorción, fase reversa y fase de formación ⁸¹.

- Fase de Resorción: el inicio de esta fase viene marcado por la acción de la PTH, que promueve la migración y diferenciación de pre-osteoclastos hacia el área del hueso que va a ser degradada. Factores como el RANKL, M-CSF y el factor quimiotáctico de monocitos (MCP-1) actúan como mediadores osteoclastogénicos en el desarrollo de esta fase ^{24,69,82}. A través de reacciones de acidificación y proteólisis de la matriz ósea y los cristales de hidroxapatita se producirá la resorción ósea, formando un valle conocido como laguna de Howship ^{8,83}.
- Fase reversa: tras la resorción del tejido, dará comienzo la fase reversa o de transición, en que las "*lining cells*", llevan a cabo la digestión del colágeno residual en las lagunas de Howship mediante catepsinas o colagenasas activadas, preparando así la superficie ósea para la acción de los osteoblastos ⁹.
- Fase de formación: el proceso de creación del nuevo tejido óseo se lleva a cabo por la acción de los osteoblastos y tiene lugar en dos etapas bien diferenciadas: la formación y maduración de la matriz osteoide, y la mineralización de dicha matriz. Una vez sustituido todo el tejido destruido por los osteoclastos por tejido nuevo, se da por concluida la fase de formación. Tras esto, la superficie ósea se recubre de células de revestimiento aplanadas y la zona en cuestión permanece en reposo hasta iniciar un nuevo ciclo de remodelación llegado el momento.

El equilibrio entre los procesos de formación y destrucción del hueso es la base de la remodelación ósea. Es fundamental que exista una adecuada coordinación entre la actividad de osteoblastos y osteoclastos, a lo que llamamos mecanismo de acoplamiento. Durante la fase resortiva, este sistema de comunicación viene regulado por distintos factores que son liberados por los osteoblastos, tales como IGF, TGF β , BMP, FGF y PDGF ⁸⁴⁻⁸⁶. Si bien, es el eje OPG/RANKL/RANK el principal complejo responsable de la regulación del remodelado óseo. El RANKL se expresa fundamentalmente en la superficie de MSC, pre-osteoblastos y células T. La unión entre RANK, expresado por pre-osteoclastos, y su ligando RANKL, estimula la activación y diferenciación de esta población celular. La OPG tiene la capacidad de interactuar con RANKL y evitar que se una a RANK, lo que le permite bloquear este complejo y prevenir la diferenciación y función de los osteoclastos ^{18,81,87}.

A medida que comprendemos mejor las complejas interacciones entre la fisiología celular y los factores ambientales, se ha vuelto evidente que ciertos compuestos químicos pueden tener un impacto significativo en la salud ósea y en los procesos reguladores del sistema endocrino. En este sentido, los osteoblastos, como células clave en la formación y remodelación del hueso, se encuentran en la primera línea de exposición a sustancias que por cualquier mecanismo puedan alterar el sistema endocrino; compuestos químicos que han despertado gran interés debido a su potencial para afectar negativamente la fisiología celular y la homeostasis hormonal.

2. DISRUPTORES ENDOCRINOS

2.1 Antecedentes históricos

Los disruptores endocrinos (EDCs), también conocidos como alteradores endocrinos, son toda aquella sustancia exógena o mezcla de sustancias que altera la función del sistema endocrino y consecuentemente causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto o en su progenie o en sus poblaciones o subpoblaciones ⁸⁸.

Desde los años 40 del siglo pasado es conocida la capacidad de algunas moléculas para interferir en el normal funcionamiento del sistema endocrino, como cuando se empezó a emplear el dietilestilbestrol para la prevención del aborto espontáneo ⁸⁹. No fue hasta 1991 que se acuñó el término de *disruptor endocrino*, durante la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, EE.UU.) en la que un grupo de expertos en endocrinología y salud reproductiva se reunieron para evaluar las causas de ciertos problemas de salud observados en estudios epidemiológicos, incluyendo trastornos de la reproducción e incremento de determinados tipos de cáncer hormono-dependientes; llegándose a discutir la posible implicación de ciertos compuestos químicos en la etiología de dichas patologías ⁹⁰.

En 1993, Sharpe y Skakkebaek plantean la hipótesis de que el incremento observado en la incidencia de malformaciones genitales masculinas congénitas podría estar relacionado con el nivel de exposición a estrógenos intra-útero ⁹¹. Según plantearon, sutiles variaciones en la concentración de estrógenos durante la etapa fetal podrían dar lugar a dichas patologías. Dicha hipótesis apuntaba como posible factor causal la exposición ambiental a contaminantes con actividad endocrina y descartaba la alteración genética como explicación a dicho incremento. Si bien, ambos factores podrían actuar de manera sinérgica.

2.2 Clasificación y criterios definitorios

Entre las sustancias clasificadas como disruptores endocrinos encontramos: hormonas, compuestos con origen vegetal (fitoestrógenos), plaguicidas, algunos compuestos usados en la fabricación de plásticos y diversos artículos de consumo frecuente, así como subproductos y residuos industriales. Su carácter persistente y su facilidad de difusión los hacen altamente ubicuos.

Para que una sustancia sea considerada un alterador endocrino, esta debe cumplir TODOS los criterios siguientes ⁹²:

- Mostrar un efecto adverso en un organismo intacto o en su progenie.
- Tener un modo de acción endocrino, es decir, altera el funcionamiento del sistema endocrino.
- Que el efecto adverso sea una consecuencia del modo de acción endocrino.
- Que las alteraciones endocrinas, que pudieren afectar a humanos y/o a cualquier otro grupo de animales, puedan ser reversibles o irreversibles.

En lo que respecta al medio ambiente, se han reportado efectos posiblemente relacionados con las alteraciones endocrinas en diversos organismos (peces, crustáceos, anfibios, pájaros, mamíferos) ⁹².

El grado en el que los disruptores endocrinos influyen en las especies depende de factores tales como:

- La intensidad o magnitud de la exposición
- La duración de la exposición
- La frecuencia con que se produce la exposición
- El momento concreto del ciclo vital en que se produce la exposición

2.3 Legislación

El Reglamento (CE) nº 1907/2006, denominado Reglamento REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) considera los disruptores endocrinos como sustancias extremadamente preocupantes, dándoles la misma consideración que a las sustancias químicas clasificadas como carcinógenas, mutágenas y reprotóxicas ⁹³. El objetivo de la reglamentación comunitaria relativa a las sustancias químicas es que se reduzca el uso de las sustancias extremadamente preocupantes y que finalmente sean sustituidas por otras alternativas más seguras ⁹².

Desde el año 2018 la Comisión Europea ha incorporado el requerimiento de evaluar y determinar las propiedades de alteración endocrina de las sustancias activas. Para ello, tras consultar con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas, se establecieron los criterios científicos para la determinación de las propiedades de alteración endocrina buscando garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y animal y del medio ambiente ⁹⁴. Las sustancias activas que tengan propiedades de alteración endocrina no se aprobarán excepto cuando se demuestre que el riesgo de exposición a la sustancia activa es desdeñable o cuando existan pruebas de que la sustancia activa es esencial para prevenir o controlar un grave peligro para la salud humana o animal o el medio ambiente.

En el ámbito de los disruptores endocrinos, la Estrategia de Sostenibilidad para las Sustancias químicas (2021) , plantea diferentes acciones, entre ellas reforzar el marco jurídico de la UE, para garantizar que dichos disruptores se reconozcan a tiempo y se minimice la exposición de seres humanos y medio ambiente, adoptando un enfoque preventivo dirigido a evitar el uso de los disruptores endocrinos en los productos de consumo e identificando los disruptores endocrinos como sustancias extremadamente preocupantes en el marco del Reglamento REACH de manera directa, como un criterio propio ⁹⁵.

2.4 Difusión y exposición

Según el informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la lista de disruptores endocrinos identificados es extensa y crece cada año a medida que aumentan los estudios en este campo ⁸⁸. Se estima que en torno a 1000 sustancias químicas de origen antropogénico podrían producir alteración endocrina ⁹⁶. Algunos de los EDCs con mayor presencia y difusión son: ftalatos, bisfenoles, sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS), retardantes de llama bromados y organofosforados, DDT, bifenilos policlorados, parabenos, triclosán, estireno, etc. Los compuestos químicos identificados como EDCs se encuentran presentes en ciertos productos de uso cotidiano: en el revestimiento de las latas de conserva ^{97,98}; en el plástico con el que están fabricados los biberones ⁹⁹; en el espermicida con que se impregnan los preservativos ¹⁰⁰; en los selladores odontológicos y en algunos materiales de uso sanitario ¹⁰¹⁻¹⁰³; en detergentes industriales ¹⁰⁴; en filtros solares ^{105,106}; en cosméticos y en pesticidas ¹⁰⁷ o en el papel térmico utilizado en los tickets ¹⁰⁸.

La exposición a EDCs es generalizada, posiblemente por una etiología multifactorial como la variedad y abundancia de estos, su facilidad de transporte por vía aérea o acuática o su baja biodegradabilidad, lo que es causa a su vez de la bioacumulación en la cadena trófica. Todo ello hace pensar que la exposición humana a los EDCs es masiva, continua y universal, aunque en dosis bajas. La vía de entrada de los contaminantes hormonales es también variada (piel, alimentos, o respiración), pero debido a su acumulación en la cadena alimentaria, la vía digestiva es la principal ruta de exposición para el hombre ^{109,110}.

A medida que aumenta la conciencia sobre los posibles efectos adversos de los EDCs en la salud humana, se ha prestado una atención significativa a un grupo particular de compuestos químicos: los bisfenoles. Los bisfenoles, en particular, han emergido como una clase prominente de EDCs debido a su amplia presencia en productos de consumo común, como plásticos, revestimientos de alimentos, utensilios y envases alimentarios. Estos compuestos químicos han despertado preocupación debido a su capacidad para

alterar procesos fisiológicos esenciales y, más específicamente, para imitar o interferir con las rutas de señalización hormonal. Debido a que presentan una estructura similar a los estrógenos, han sido implicados en múltiples efectos adversos sobre la salud. Por lo tanto, es esencial investigar en detalle los efectos específicos de los bisfenoles, con el fin de comprender mejor los riesgos asociados a la exposición a estos y desarrollar estrategias adecuadas para mitigarlos.

3. BISFENOLES

3.1 Bisfenol A

3.1.1 Antecedentes

El bisfenol A (BPA; 4,4'-isopropilidendifenol; número de registro CAS 80-05-7) (Figura 2) es un compuesto orgánico compuesto por dos anillos fenólicos conectados por un puente metilo, con dos grupos funcionales metilo unidos al puente. El BPA se utiliza como material para la producción de resinas fenólicas, poliácridatos y poliésteres, y principalmente para la producción de resinas epoxi y plásticos de policarbonato ¹¹¹. Fue sintetizado por primera vez por el químico ruso Aleksandr Pavlovich Dianin en 1891 y se conoció su actividad como disruptor endocrino en 1936 ¹¹².

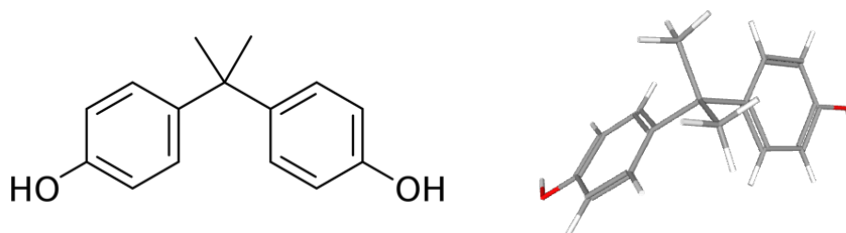


Fig.2: Estructura química del BPA

3.1.2 Características físico-químicas

El BPA tiene un punto de fusión relativamente alto, de alrededor de 158°C, es decir, se solidifica a temperaturas relativamente bajas y es estable a temperaturas normales. Tiene un peso molecular de 228,29 g/mol y es soluble en solventes orgánicos; sin embargo, es prácticamente insoluble en agua. El BPA se puede polimerizar para producir policarbonato. ¹¹³

3.1.3 Propiedades industriales

El BPA es uno de los compuestos con mayor volumen de producción a nivel mundial, con cifras de en torno a ocho millones de toneladas anuales, estando China a la cabeza

de su producción y con una previsión de casi 10 toneladas de fabricación para el año 2025 ¹¹⁴. De ese total producido, una parte se libera al medio ambiente ¹¹⁵. Pese a ello, la concentración de BPA libre en la naturaleza no es tan alta como podría imaginarse dado que, cuando se expone al aire, sufre fotooxidación y degradación, lo que conduce a una vida media baja ¹¹⁴.

Debido a su propiedad de resistir altas temperaturas (hasta 145°C) e impactos, los policarbonatos tienen diversas aplicaciones, como botellas de agua, biberones, juguetes, papel térmico, electrodomésticos y productos médicos, papel térmico, etc. Las resinas epoxi se utilizan como recubrimientos protectores internos para envases de alimentos y bebidas, adhesivos, pinturas y barnices. No sólo está presente en los envases de alimentos y bebidas, sino también en algunos materiales dentales ¹⁰². Los productos plásticos en los que con mayor probabilidad la presencia de BPA es elevada son aquellos marcados en su parte inferior por el código RIC nº 3, 6 o 7 (Figura 3).



Fig. 3: Códigos de identificación de resinas de plástico. ISO 1043.

3.1.4 Exposición humana al BPA

El BPA puede desprenderse de los envases de policarbonato y solubilizarse; el calor y el pH del medio aceleran la hidrólisis del enlace éster que une los monómeros de BPA, lo que conduce a una liberación de BPA con la consiguiente exposición humana ¹¹⁶. Se considera que es la alimentación la principal fuente de exposición al BPA. En este sentido, autores como Liao *et al.* informaron que el 75 % de los 267 alimentos analizados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), tenían bisfenoles en concentraciones que oscilaban entre 0,10 ng/g y 1130 ng/g ¹¹⁷. Además, se ha observado que la concentración de BPA es mayor en los alimentos enlatados que en los alimentos frescos ¹¹⁸. Es tal el nivel de exposición que

algunos autores señalan que entre el 90 y el 95 % de la población de Estados Unidos tiene niveles detectables de BPA en orina ¹¹⁹⁻¹²¹.

3.1.5 Efectos sobre la salud

Tradicionalmente, el BPA se ha considerado un xenoestrógeno débil, dado que tiene una menor afinidad por los receptores nucleares de estrógenos que el 17- β estradiol, así como una baja actividad transcripcional tras la activación de estos ¹¹².

Los receptores de estrógenos (RE) se dividen en dos subtipos alfa y beta. Los RE- α están presentes predominantemente en endometrio, cáncer de mama, estroma ovárico e hipotálamo. Los RE- β , por su parte, se expresan en riñón, cerebro, pulmón, corazón, intestino, próstata, células endoteliales y tejido óseo ¹²². El BPA se une selectivamente al RE- α y al RE- β , aunque presenta mayor afinidad por el RE- β . Esta unión al dominio ligando no se realiza de la misma forma en que lo hace el estradiol, por lo que los efectos intracelulares serán presumiblemente diferentes. En algunos tipos celulares, el BPA presenta una actividad agonista a través de RE- β y una actividad mixta agonista y antagonista a través del RE- α ¹²²⁻¹²⁴.

Existe un tercer tipo de receptor nuclear, el RE- γ , recientemente descrito y para el cual aún no se conoce una función específica, siendo además huérfano de ligando natural en el organismo. Este receptor se une de manera muy específica y con alta afinidad al BPA ^{125,126}. Algunos estudios apuntan a que el BPA puede promover efectos similares a los estrógenos incluso a dosis bajas, por medio de vías no-clásicas que todavía no conocemos en profundidad, como podría ser la del RE- γ ^{112,125}. Estas interferencias con las vías de señalización endocrina se producen durante el periodo fetal, neonatal y en la edad adulta.

El BPA interacciona e interfiere con varias vías de señalización celular mediadas por receptores de membrana y receptores nucleares como los RE previamente descritos, los receptores de peroxisoma-proliferador-activado gamma, los receptores del factor de crecimiento epidérmico o el factor nuclear eritroide 2, ejerciendo un efecto disruptivo sobre

procesos tales como la carcinogénesis, el crecimiento y proliferación celular, la migración celular, la apoptosis o la resistencia a los fármacos anticancerosos ^{127–130}. Esto se asocia con patologías cardiovasculares, endocrino-metabólicas, reproductivas, neoplásicas y degenerativas (Figura 4). También parece promover una desregulación epigenética en la expresión de ciertas proteínas y marcadores relacionados con el metabolismo energético, ejerciendo un efecto obesogénico ¹³¹.

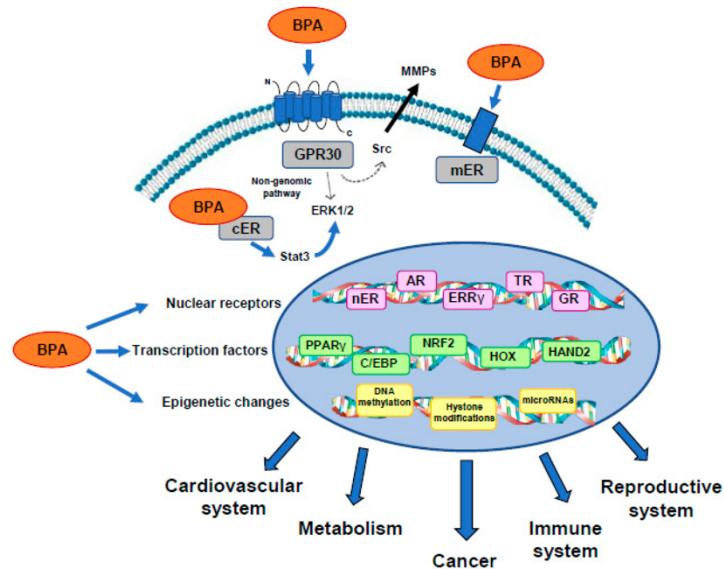


Fig. 4: Esquema del mecanismo molecular de acción del BPA (Cimmino *et al.*, 2020) ¹²⁹.

3.1.6 Regulación normativa

Numerosos estudios publicados hasta la fecha muestran que el BPA tiene múltiples efectos nocivos para la salud, produciendo alteraciones sobre el metabolismo, el neurodesarrollo, la fertilidad, la salud cardiovascular o la incidencia de ciertos tipos de cáncer, entre otros ^{114,115,132–136}. Por ello, la EFSA ha ido reduciendo la cantidad de ingesta diaria admisible de dicho compuesto, llegándose a reducir a 4 µg/kg/día en 2015 ¹¹⁸. Con respecto al agua de consumo humano, la última normativa en nuestro país respecto a los criterios técnico-sanitarios establece un límite tolerable de 2.5 µg/L., cifra mucho menor a la de otros contaminantes regulados como el arsénico, el cianuro o el uranio (R.D. 3/2023 de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro) ¹³⁷.

Algunos gobiernos nacionales y transnacionales, como Canadá o la Unión Europea (UE), tras conocer que los niveles de BPA eran más elevados en fetos, bebés y niños afectando al desarrollo neuronal ^{121,138}, han vetado el uso de BPA en los biberones y chupetes de plástico ¹³⁹. En 2018, la UE introdujo límites más estrictos para el uso de BPA en materiales destinados a estar en contacto con alimentos, derivados de la modificación de la ingesta diaria admisible establecida por la EFSA. Desde ese mismo año, el BPA está prohibido en botellas y envases de plástico que contienen alimentos para bebés y niños menores de tres años ¹⁴⁰.

3.1.7 Análogos

En este sentido y debido a la mayor concienciación por parte de la población de la conveniencia de optar por los productos “*BPA free*”, la industria ha reaccionado fabricando productos con fórmulas que no contienen BPA; sin embargo, que sean libres de BPA no significa que estén exentos de actividad estrogénica, dado que en la fabricación de estos productos se permuta el BPA por moléculas análogas a este como el Bisfenol S (BPS), el Bisfenol F (BPF) o el Bisfenol AF (BPAF), que quedan fuera de la limitación aplicada al BPA, al no existir evidencia sobre su peligrosidad ^{134,141}. No obstante, se ha demostrado que son tan activos desde el punto de vista hormonal como el BPA ^{125,141-143}; e incluso, estudios experimentales sugieren que su efecto podría no diferir mucho del atribuido al BPA ^{135,142,144}.

3.2 Bisfenol S

El bisfenol S (BPS; 4,4-sulfonildifenol; número de registro CAS 80-09-1) (Figura 5) es un compuesto orgánico utilizado como sustituto del BPA. Es un sólido cristalino incoloro a temperatura ambiente y se encuentra en forma de polvo blanco. Su masa molar es de 250.27 g/mol, tiene un punto de fusión de 240.5 °C. También tiene una densidad de 1,36 g/cm³. El BPS es soluble en solventes orgánicos e insoluble en agua. Es estable bajo condiciones normales de temperatura y presión, y no reacciona con ácidos, bases o agentes oxidantes. Químicamente, el BPS ha sido modificado para contener un grupo sulfona en

lugar de un grupo carbonilo en su estructura. Esta modificación le da al BPS una mayor estabilidad térmica y química en comparación con el BPA ¹⁴⁵

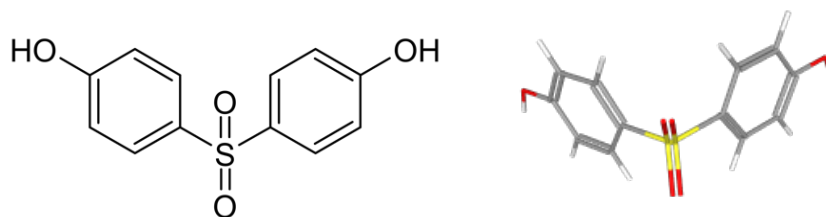


Fig.5: Estructura química del BPS

Si bien el BPS ha sido considerado una alternativa prometedora al BPA debido a su menor toxicidad relativa, algunos estudios apuntan que el BPS no está exento de efectos adversos, ya que también muestra una actividad endocrina similar, alterando la capacidad reproductiva ¹⁴⁶, la función cardiovascular ¹⁴⁷, inhibiendo la actividad del sistema inmune ¹⁴⁸ y ejerciendo efectos obesogénicos¹⁴⁹; lo que subraya la necesidad de una evaluación cuidadosa de los riesgos asociados con su uso en productos de consumo.

3.3 Bisfenol F

El bisfenol F (BPF; 4,4'-metilendifenol; número de registro CAS 620-92-8) es otro de los compuestos orgánico perteneciente a la familia de los bisfenoles cuyo uso se ha extendido en sustitución del BPA. El BPF tiene una estructura similar al BPA, pero con dos grupos metilo en lugar de dos grupos metoxi en los anillos fenólicos (Figura 6). Las características físicas y químicas del BPF son similares a las del BPA, aunque el BPF es menos soluble en agua y más estable térmicamente que el BPA. Su peso molecular es de 200.23 g/mol. Tiene un punto de fusión de 162.5 °C, y una densidad de 1,2 g/cm³ ¹⁵⁰.

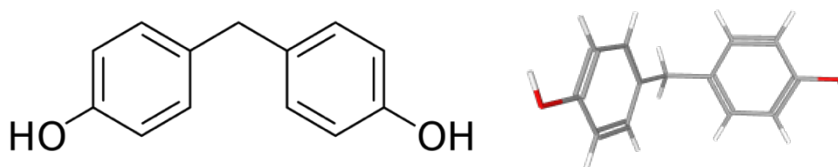


Fig.6: Estructura química del BPF

A pesar de su similitud con el BPA en relación con sus características físicas y químicas, el BPF tiene una estructura química ligeramente diferente al BPA, lo que le confiere una mayor estabilidad térmica y resistencia a la degradación. Las características toxicológicas del BPF no están tan bien estudiadas como las del BPA, pero se ha demostrado que el BPF tiene efectos endocrinos similares al BPA, actuando como un agonista débil de los receptores de estrógenos y andrógenos. El BPF también puede interferir con el metabolismo de los esteroides y la función tiroidea, así como inducir estrés oxidativo y daño genético en las células. Algunos estudios han sugerido que el BPF puede tener efectos adversos sobre el desarrollo embrionario y el crecimiento, la reproducción, el sistema nervioso y el sistema inmunológico ^{136,142,151-153}.

3.4 Bisfenol AF

El bisfenol AF (BPAF; 2,2-Bis(4-hidroxifenil)hexafluoropropano; número de registro CAS 1478-61-1) es un análogo del bisfenol A (BPA) que se utiliza como monómero para la síntesis de polímeros y resinas. El BPAF tiene una estructura similar al BPA, pero con dos grupos trifluorometilo sustituyendo a los grupos hidroxilo en las posiciones 2 y 2' de los anillos fenólicos (Figura 7).

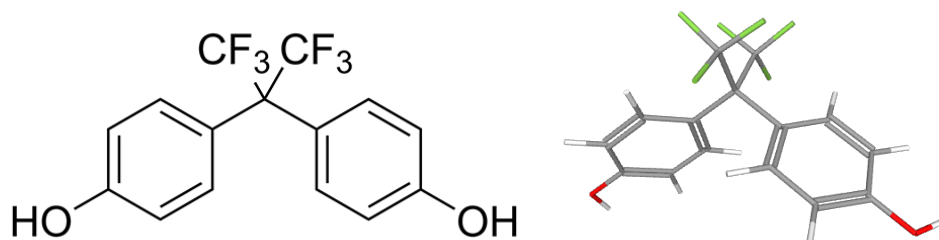


Fig. 7: Estructura química del BPAF

Es un sólido cristalino blanco o ligeramente amarillo, con un punto de fusión de 162 °C y una densidad de 1.4 g/cm³. Su peso molecular es de 336.23 g/mol. Es soluble en disolventes orgánicos como el etanol, el acetato de etilo y el cloroformo, pero prácticamente insoluble en agua ¹⁵⁴.

Es un compuesto aromático con dos grupos fenólicos que pueden actuar como aceptores o donantes de protones ¹⁵⁴. Debido a la presencia de los átomos de flúor, el

BPAF es más estable y menos reactivo que el BPA frente a agentes oxidantes, reductores, ácidos y bases. Muestra una estabilidad térmica moderada y puede soportar temperaturas relativamente altas sin descomponerse. Se usa como agente de entrecruzamiento para algunos fluoroelastómeros y como monómero para poliimidas, poliamidas, poliésteres, copolímeros de policarbonato y otros polímeros ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Mientras que el BPA tiene una alta afinidad por el RE- γ , el BPAF no parece unirse de manera notable al mismo. Sin embargo, el BPAF tiene una mayor afinidad por los RE- α y RE- β que el BPA, y puede activar o inhibir su actividad dependiendo del contexto celular, lo que le confiere una mayor actividad estrogénica, por lo que puede alterar el metabolismo, la reproducción, el desarrollo, el sistema nervioso y el sistema inmunitario ^{125,129,136,143}. También puede alterar la expresión de genes relacionados con el metabolismo, la inflamación, el desarrollo y la diferenciación celular ^{158,159}. Además de su alta afinidad por los RE, la preocupación por este EDC radica en su capacidad para persistir en los ecosistemas debido a su baja biodegradabilidad y alta adsorción a las partículas orgánicas e inorgánicas, lo que le permite bioacumularse en los tejidos de los organismos acuáticos y terrestres por presentar una elevada lipofilia y una baja excreción ¹⁶⁰.

Es conocido que los BPs poseen actividad estrogénica o antiestrogénica en función de la población celular sobre la que ejerzan su acción alterando el normal funcionamiento del sistema endocrino. Sin embargo, la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo en otras poblaciones celulares y no han evaluado el impacto que estas moléculas pueden tener en el tejido óseo humano, no hallándose en la literatura científica evidencia suficiente respecto a la posible influencia de dichas sustancias sobre parámetros de diferenciación/maduración celular y los mecanismos de acción que subyacen al efecto que estos EDCs ejercen sobre el hueso, lo cual hace que su estudio sea de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bala, Y.; Farlay, D.; Boivin, G. Bone Mineralization: From Tissue to Crystal in Normal and Pathological Contexts. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 2013, 24, 2153–2166, doi:10.1007/s00198-012-2228-y.
2. Ansari, M. Bone Tissue Regeneration: Biology, Strategies and Interface Studies. *Prog. Biomater.* 2019, 8, 223–237, doi:10.1007/s40204-019-00125-z.
3. Qiu, Z.-Y.; Cui, Y.; Wang, X.-M. Chapter 1 - Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. In *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes*; Wang, X.-M., Qiu, Z.-Y., Cui, H., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2019; pp. 1–22 ISBN 978-0-08-102717-2.
4. Titorencu, I.; Pruna, V.; Jinga, V.V.; Simionescu, M. Osteoblast Ontogeny and Implications for Bone Pathology: An Overview. *Cell Tissue Res.* 2014, 355, 23–33, doi:10.1007/s00441-013-1750-3.
5. Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014, 561, 3–12, doi:10.1016/j.abb.2014.05.003.
6. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R. da S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 2015, 421746, doi:10.1155/2015/421746.
7. Jayakumar, P.; Di Silvio, L. Osteoblasts in Bone Tissue Engineering. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]* 2010, 224, 1415–1440, doi:10.1243/09544119JEIM821.
8. Eriksen, E.F. Cellular Mechanisms of Bone Remodeling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2010, 11, 219–227, doi:10.1007/s11154-010-9153-1.
9. Everts, V.; Delaissé, J.M.; Korper, W.; Jansen, D.C.; Tigchelaar-Gutter, W.; Saftig, P.; Beertsen, W. The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2002, 17, 77–90, doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.77.
10. Al-Azab, M.; Safi, M.; Idiatullina, E.; Al-Shaebi, F.; Zaky, M.Y. Aging of Mesenchymal Stem Cell: Machinery, Markers, and Strategies of Fighting. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2022, 27, 69, doi:10.1186/s11658-022-00366-0.

11. Amarasekara, D.S.; Kim, S.; Rho, J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 2851, doi:10.3390/ijms22062851.
12. Giustina, A.; Mazziotti, G.; Canalis, E. Growth Hormone, Insulin-like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocr. Rev.* 2008, *29*, 535–559, doi:10.1210/er.2007-0036.
13. Kapinas, K.; Delany, A.M. MicroRNA Biogenesis and Regulation of Bone Remodeling. *Arthritis Res. Ther.* 2011, *13*, 220, doi:10.1186/ar3325.
14. Histology of Bone: Background, Gross Structure of Long Bone, Nerves and Vasculature of Bone. 2023.
15. Moser, S.C.; van der Eerden, B.C.J. Osteocalcin—A Versatile Bone-Derived Hormone. *Front. Endocrinol.* 2019, *9*, 794, doi:10.3389/fendo.2018.00794.
16. Tanaka, S.; Narusawa, K.; Onishi, H.; Miura, M.; Hijioka, A.; Kanazawa, Y.; Nishida, S.; Ikeda, S.; Nakamura, T. Lower Osteocalcin and Osteopontin Contents of the Femoral Head in Hip Fracture Patients than Osteoarthritis Patients. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 2011, *22*, 587–597, doi:10.1007/s00198-010-1328-9.
17. Kim, J.-M.; Lin, C.; Stavre, Z.; Greenblatt, M.B.; Shim, J.-H. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 2020, *9*, 2073, doi:10.3390/cells9092073.
18. Udagawa, N.; Koide, M.; Nakamura, M.; Nakamichi, Y.; Yamashita, T.; Uehara, S.; Kobayashi, Y.; Furuya, Y.; Yasuda, H.; Fukuda, C.; et al. Osteoclast Differentiation by RANKL and OPG Signaling Pathways. *J. Bone Miner. Metab.* 2021, *39*, 19–26, doi:10.1007/s00774-020-01162-6.
19. McKee, M.D.; Pedraza, C.E.; Kaartinen, M.T. Osteopontin and Wound Healing in Bone. *Cells Tissues Organs* 2011, *194*, 313–319, doi:10.1159/000324244.
20. Icer, M.A.; Gezmen-Karadag, M. The Multiple Functions and Mechanisms of Osteopontin. *Clin. Biochem.* 2018, *59*, 17–24, doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003.
21. Bailey, S.; Karsenty, G.; Gundberg, C.; Vashishth, D. Osteocalcin and Osteopontin Influence Bone Morphology and Mechanical Properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2017, *1409*, 79–84, doi:10.1111/nyas.13470.
22. Si, J.; Wang, C.; Zhang, D.; Wang, B.; Zhou, Y. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2020, *26*, e919159, doi:10.12659/MSM.919159.

23. Varma, S.; Orgel, J.P.R.O.; Schieber, J.D. Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophys. J.* 2016, *111*, 50–56, doi:10.1016/j.bpj.2016.05.038.
24. Alford, A.I.; Kozloff, K.M.; Hankenson, K.D. Extracellular Matrix Networks in Bone Remodeling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015, *65*, 20–31, doi:10.1016/j.biocel.2015.05.008.
25. Reyes-Botella, C.; Montes, M.J.; Vallecillo-Capilla, M.F.; Olivares, E.G.; Ruiz, C. Antigenic Phenotype of Cultured Human Osteoblast-like Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2002, *12*, 359–364, doi:10.1159/000067906.
26. Bachelard-Cascales, E.; Chapellier, M.; Delay, E.; Pochon, G.; Voeltzel, T.; Puisieux, A.; Caron de Fromental, C.; Maguer-Satta, V. The CD10 Enzyme Is a Key Player to Identify and Regulate Human Mammary Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 2010, *28*, 1081–1088, doi:10.1002/stem.435.
27. Lee, K.-W.; Sung, C.O.; Kim, J.H.; Kang, M.; Yoo, H.-Y.; Kim, H.-H.; Um, S.-H.; Kim, S.-H. CD10 Expression Is Enhanced by Twist1 and Associated with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma with Facilitating Tumorigenicity in Vitro and in Vivo. *Int. J. Cancer* 2015, *136*, 310–321, doi:10.1002/ijc.29006.
28. Cappellesso-Fleury, S.; Puissant-Lubrano, B.; Apoil, P.-A.; Titeux, M.; Winterton, P.; Casteilla, L.; Bourin, P.; Blancher, A. Human Fibroblasts Share Immunosuppressive Properties with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J. Clin. Immunol.* 2010, *30*, 607–619, doi:10.1007/s10875-010-9415-4.
29. A. Osborne, B.; Kuby, J.; A. Goldsby, R.; J. Kindt, T. *Inmunología de Kuby*; 6ª edición.; McGraw-Hill, Madrid, 2007; ISBN 978-1-4562-1996-3.
30. Reyes-Botella, C.; Montes, M.J.; Abadía-Molina, A.C.; Vallecillo-Capilla, M.F.; Ruiz, C. CD10 Expression in Cultured Human Osteoblast-like Cells. *Folia Biol. (Praha)* 1999, *45*, 257–260.
31. Díaz-Rodríguez, L.; García-Martínez, O.; Arroyo-Morales, M.; Reyes-Botella, C.; Ruiz, C. Antigenic Phenotype and Phagocytic Capacity of MG-63 Osteosarcoma Line. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, *1173 Suppl 1*, E46-54, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04950.x.

32. García-Martínez, O.; Reyes-Botella, C.; Aguilera-Castillo, O.; Vallecillo-Capilla, M.F.; Ruiz, C. Antigenic Profile of Osteoblasts Present in Human Bone Tissue Sections. *Biosci. Rep.* 2006, *26*, 39–43, doi:10.1007/s10540-006-9006-z.
33. Borland, G.; Ross, J.A.; Guy, K. Forms and Functions of CD44. *Immunology* 1998, *93*, 139–148, doi:10.1046/j.1365-2567.1998.00431.x.
34. Chen, C.; Zhao, S.; Karnad, A.; Freeman, J.W. The Biology and Role of CD44 in Cancer Progression: Therapeutic Implications. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 2018, *11*, 64, doi:10.1186/s13045-018-0605-5.
35. Hassn Mesrati, M.; Syafruddin, S.E.; Mohtar, M.A.; Syahir, A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules* 2021, *11*, 1850, doi:10.3390/biom11121850.
36. Orian-Rousseau, V.; Schmitt, M. CD44 Regulates Wnt Signaling at the Level of LRP6. *Mol. Cell. Oncol.* 2015, *2*, e995046, doi:10.4161/23723556.2014.995046.
37. Bozec, A.; Zaiss, M.M.; Kagwiria, R.; Voll, R.; Rauh, M.; Chen, Z.; Mueller-Schmucker, S.; Kroczeck, R.A.; Heinzerling, L.; Moser, M.; et al. T Cell Costimulation Molecules CD80/86 Inhibit Osteoclast Differentiation by Inducing the IDO/Tryptophan Pathway. *Sci. Transl. Med.* 2014, *6*, 235ra60, doi:10.1126/scitranslmed.3007764.
38. Díaz-Rodríguez, L.; García-Martínez, O.; Morales, M.A.-; Rodríguez-Pérez, L.; Rubio-Ruiz, B.; Ruiz, C. Effects of Indomethacin, Nimesulide, and Diclofenac on Human MG-63 Osteosarcoma Cell Line. *Biol. Res. Nurs.* 2012, *14*, 98–107, doi:10.1177/1099800411398933.
39. Pérez, E.; García-Martínez, O.; Arroyo-Morales, M.; Reyes-Botella, C.; Ruiz, C. Modulation of Antigenic Phenotype in Cultured Human Osteoblast-like Cells by FGFb, TGFbeta1, PDGF-BB, IL-2, IL-1beta, LPS and IFNgamma. *Biosci. Rep.* 2006, *26*, 281–289, doi:10.1007/s10540-006-9022-z.
40. García-Martínez, O.; Reyes-Botella, C.; Díaz-Rodríguez, L.; De Luna-Bertos, E.; Ramos-Torrecillas, J.; Vallecillo-Capilla, M.F.; Ruiz, C. Effect of Platelet-Rich Plasma on Growth and Antigenic Profile of Human Osteoblasts and Its Clinical Impact. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2012, *70*, 1558–1564, doi:10.1016/j.joms.2011.06.199.

41. García-Martínez, O.; Díaz-Rodríguez, L.; Rodríguez-Pérez, L.; De Luna-Bertos, E.; Reyes Botella, C.; Ruiz, C.C. Effect of Acetaminophen, Ibuprofen and Methylprednisolone on Different Parameters of Human Osteoblast-like Cells. *Arch. Oral Biol.* 2011, *56*, 317–323, doi:10.1016/j.archoralbio.2010.10.018.
42. Hinoi, E.; Fujimori, S.; Wang, L.; Hojo, H.; Uno, K.; Yoneda, Y. Nrf2 Negatively Regulates Osteoblast Differentiation via Interfering with Runx2-Dependent Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* 2006, *281*, 18015–18024, doi:10.1074/jbc.M600603200.
43. Komori, T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, *20*, E1694, doi:10.3390/ijms20071694.
44. Komori, T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol. Cells* 2020, *43*, 168–175, doi:10.14348/molcells.2019.0244.
45. Komori, T. Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, *23*, 5776, doi:10.3390/ijms23105776.
46. Yamaguchi, A.; Komori, T.; Suda, T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 2000, *21*, 393–411, doi:10.1210/edrv.21.4.0403.
47. Garcia, T.; Roman-Roman, S.; Jackson, A.; Theilhaber, J.; Connolly, T.; Spinella-Jaegle, S.; Kawai, S.; Courtois, B.; Bushnell, S.; Auberval, M.; et al. Behavior of Osteoblast, Adipocyte, and Myoblast Markers in Genome-Wide Expression Analysis of Mouse Calvaria Primary Osteoblasts in Vitro. *Bone* 2002, *31*, 205–211, doi:10.1016/s8756-3282(02)00781-0.
48. Malaval, L.; Liu, F.; Roche, P.; Aubin, J.E. Kinetics of Osteoprogenitor Proliferation and Osteoblast Differentiation in Vitro. *J. Cell. Biochem.* 1999, *74*, 616–627.
49. Anderson, H.C.; Sipe, J.B.; Hessle, L.; Dhanyamraju, R.; Atti, E.; Camacho, N.P.; Millán, J.L.; Dhanyamraju, R. Impaired Calcification around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* 2004, *164*, 841–847, doi:10.1016/s0002-9440(10)63172-0.
50. Roberts, S.; Narisawa, S.; Harmey, D.; Millán, J.L.; Farquharson, C. Functional Involvement of PHOSPHO1 in Matrix Vesicle-Mediated Skeletal Mineralization. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2007, *22*, 617–627, doi:10.1359/jbmr.070108.

51. Yoshiko, Y.; Candelieri, G.A.; Maeda, N.; Aubin, J.E. Osteoblast Autonomous Pi Regulation via Pit1 Plays a Role in Bone Mineralization. *Mol. Cell. Biol.* 2007, 27, 4465–4474, doi:10.1128/MCB.00104-07.
52. Matsuo, K.; Irie, N. Osteoclast-Osteoblast Communication. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 473, 201–209, doi:10.1016/j.abb.2008.03.027.
53. Chen, X.; Wang, Z.; Duan, N.; Zhu, G.; Schwarz, E.M.; Xie, C. Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connect. Tissue Res.* 2018, 59, 99–107, doi:10.1080/03008207.2017.1290085.
54. Yamamoto, T.; Kaizu, C.; Kawasaki, T.; Hasegawa, G.; Umezu, H.; Ohashi, R.; Sakurada, J.; Jiang, S.; Shultz, L.; Naito, M. Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Indispensable for Repopulation and Differentiation of Kupffer Cells but Not for Splenic Red Pulp Macrophages in Osteopetrotic (Op/Op) Mice after Macrophage Depletion. *Cell Tissue Res.* 2008, 332, 245–256, doi:10.1007/s00441-008-0586-8.
55. Yavropoulou, M.P.; Yovos, J.G. Osteoclastogenesis--Current Knowledge and Future Perspectives. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2008, 8, 204–216.
56. Clinkenbeard, E.L.; Cass, T.A.; Ni, P.; Hum, J.M.; Bellido, T.; Allen, M.R.; White, K.E. Conditional Deletion of Murine Fgf23: Interruption of the Normal Skeletal Responses to Phosphate Challenge and Rescue of Genetic Hypophosphatemia. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2016, 31, 1247–1257, doi:10.1002/jbmr.2792.
57. Karsenty, G. Bone Endocrine Regulation of Energy Metabolism and Male Reproduction. *C. R. Biol.* 2011, 334, 720–724, doi:10.1016/j.crv.2011.07.007.
58. Lee, N.K.; Sowa, H.; Hinoi, E.; Ferron, M.; Ahn, J.D.; Confavreux, C.; Dacquin, R.; Mee, P.J.; McKee, M.D.; Jung, D.Y.; et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* 2007, 130, 456–469, doi:10.1016/j.cell.2007.05.047.
59. Riquelme-Gallego, B.; García-Molina, L.; Cano-Ibáñez, N.; Sánchez-Delgado, G.; Andújar-Vera, F.; García-Fontana, C.; González-Salvatierra, S.; García-Recio, E.; Martínez-Ruiz, V.; Bueno-Cavanillas, A.; et al. Circulating Undercarboxylated Osteocalcin as Estimator of Cardiovascular and Type 2 Diabetes Risk in Metabolic Syndrome Patients. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1840, doi:10.1038/s41598-020-58760-7.
60. Ruiz, C.; Pérez, E.; García-Martínez, O.; Díaz-Rodríguez, L.; Arroyo-Morales, M.; Reyes-Botella, C. Expression of Cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ

- and Modulation by Different Growth Factors in Cultured Human Osteoblast-like Cells. *J. Bone Miner. Metab.* 2007, 25, 286–292, doi:10.1007/s00774-007-0767-7.
61. Ruiz, C.; Pérez, E.; Vallecillo-Capilla, M.; Reyes-Botella, C. Phagocytosis and Allogeneic T Cell Stimulation by Cultured Human Osteoblast-like Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003, 13, 309–314, doi:10.1159/000074546.
 62. Stanley, K.T.; VanDort, C.; Motyl, C.; Endres, J.; Fox, D.A. Immunocompetent Properties of Human Osteoblasts: Interactions with T Lymphocytes. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2006, 21, 29–36, doi:10.1359/JBMR.051004.
 63. Franz-Odenaal, T.A.; Hall, B.K.; Witten, P.E. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2006, 235, 176–190, doi:10.1002/dvdy.20603.
 64. Dallas, S.L.; Prideaux, M.; Bonewald, L.F. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocr. Rev.* 2013, 34, 658–690, doi:10.1210/er.2012-1026.
 65. Bonewald, L.F. The Amazing Osteocyte. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2011, 26, 229–238, doi:10.1002/jbmr.320.
 66. Xiao, Z.; Zhang, S.; Mahlios, J.; Zhou, G.; Magenheimer, B.S.; Guo, D.; Dallas, S.L.; Maser, R.; Calvet, J.P.; Bonewald, L.; et al. Cilia-like Structures and Polycystin-1 in Osteoblasts/Osteocytes and Associated Abnormalities in Skeletogenesis and Runx2 Expression. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 30884–30895, doi:10.1074/jbc.M604772200.
 67. Boyle, W.J.; Simonet, W.S.; Lacey, D.L. Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature* 2003, 423, 337–342, doi:10.1038/nature01658.
 68. Datta, H.K.; Ng, W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S. The Cell Biology of Bone Metabolism. *J. Clin. Pathol.* 2008, 61, 577–587, doi:10.1136/jcp.2007.048868.
 69. Henriksen, K.; Neutzsky-Wulff, A.V.; Bonewald, L.F.; Karsdal, M.A. Local Communication on and within Bone Controls Bone Remodeling. *Bone* 2009, 44, 1026–1033, doi:10.1016/j.bone.2009.03.671.
 70. Sims, N.A.; Vrahnas, C. Regulation of Cortical and Trabecular Bone Mass by Communication between Osteoblasts, Osteocytes and Osteoclasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014, 561, 22–28, doi:10.1016/j.abb.2014.05.015.

71. Phan, T.C.A.; Xu, J.; Zheng, M.H. Interaction between Osteoblast and Osteoclast: Impact in Bone Disease. *Histol. Histopathol.* 2004, *19*, 1325–1344, doi:10.14670/HH-19.1325.
72. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I.; Alobera Gracia, M.A.; Canto Pingarrón, M. del; Blanco Jerez, L. Bases Fisiológicas de La Regeneración Ósea I: Histología y Fisiología Del Tejido Óseo. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal Internet* 2006, *11*, 47–51.
73. Muñoz-Torres, M.; García, R.R. Catepsina K y resorción ósea. *REEMO* 2006, *15*, 88–89, doi:10.1016/S1132-8460(06)75270-9.
74. Downey, P.A.; Siegel, M.I. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Phys. Ther.* 2006, *86*, 77–91, doi:10.1093/ptj/86.1.77.
75. Aszódi, A.; Bateman, J.F.; Gustafsson, E.; Boot-Handford, R.; Fässler, R. Mammalian Skeletogenesis and Extracellular Matrix: What Can We Learn from Knockout Mice? *Cell Struct. Funct.* 2000, *25*, 73–84, doi:10.1247/csf.25.73.
76. Viguet-Carrin, S.; Garnero, P.; Delmas, P.D. The Role of Collagen in Bone Strength. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 2006, *17*, 319–336, doi:10.1007/s00198-005-2035-9.
77. Ganss, B.; Kim, R.H.; Sodek, J. Bone Sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 1999, *10*, 79–98, doi:10.1177/10454411990100010401.
78. Lamoureux, F.; Baud'huin, M.; Duplomb, L.; Heymann, D.; Rédini, F. Proteoglycans: Key Partners in Bone Cell Biology. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 2007, *29*, 758–771, doi:10.1002/bies.20612.
79. Gundberg, C.M. Matrix Proteins. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 2003, *14 Suppl 5*, S37-40; discussion S40-42, doi:10.1007/s00198-003-1471-7.
80. Em, H.; D, Q.; Ef, E.; L, M.; F, M. Cancellous Bone Remodeling Occurs in Specialized Compartments Lined by Cells Expressing Osteoblastic Markers. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2001, *16*, doi:10.1359/jbmr.2001.16.9.1575.
81. Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I. Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, *1092*, 385–396, doi:10.1196/annals.1365.035.

82. Li, X.; Qin, L.; Bergenstock, M.; Bevelock, L.M.; Novack, D.V.; Partridge, N.C. Parathyroid Hormone Stimulates Osteoblastic Expression of MCP-1 to Recruit and Increase the Fusion of Pre/Osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 2007, *282*, 33098–33106, doi:10.1074/jbc.M611781200.
83. Teitelbaum, S.L. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 2000, *289*, 1504–1508, doi:10.1126/science.289.5484.1504.
84. Tang, Y.; Wu, X.; Lei, W.; Pang, L.; Wan, C.; Shi, Z.; Zhao, L.; Nagy, T.R.; Peng, X.; Hu, J.; et al. TGF-Beta1-Induced Migration of Bone Mesenchymal Stem Cells Couples Bone Resorption with Formation. *Nat. Med.* 2009, *15*, 757–765, doi:10.1038/nm.1979.
85. de Gorter, D.J.J.; van Dinther, M.; Korchynskiy, O.; ten Dijke, P. Biphasic Effects of Transforming Growth Factor β on Bone Morphogenetic Protein-Induced Osteoblast Differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2011, *26*, 1178–1187, doi:10.1002/jbmr.313.
86. Ripamonti, U.; Ferretti, C.; Heliotis, M. Soluble and Insoluble Signals and the Induction of Bone Formation: Molecular Therapeutics Recapitulating Development. *J. Anat.* 2006, *209*, 447–468, doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00635.x.
87. Khosla, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001, *142*, 5050–5055, doi:10.1210/endo.142.12.8536.
88. WHO Team (Environment, Climate Change and Health) *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012*; WHO/UNEP, 2012; ISBN 978 92 4 150503 1.
89. Newbold, R.R.; Padilla-Banks, E.; Jefferson, W.N. Adverse Effects of the Model Environmental Estrogen Diethylstilbestrol Are Transmitted to Subsequent Generations. *Endocrinology* 2006, *147*, S11-17, doi:10.1210/en.2005-1164.
90. Colborn, T.; Clement, C. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Adv. Mod. Environ. Toxicol. USA* 1992.
91. Sharpe, R.M.; Skakkebaek, N.E. Are Oestrogens Involved in Falling Sperm Counts and Disorders of the Male Reproductive Tract? *Lancet Lond. Engl.* 1993, *341*, 1392–1395, doi:10.1016/0140-6736(93)90953-e.

92. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Alteradores Endocrinos. Disponible online: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/AlteradorEndocrino.aspx>.
93. *Reglamento (CE) n o 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006 , relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n o 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n o 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión; 2006; Vol. 396;.*
94. *Reglamento (UE) 2018/605 de la Comisión, de 19 de abril de 2018, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n.º 1107/2009 al establecer criterios científicos para la determinación de las propiedades de alteración endocrina (Texto pertinente a efectos del EEE.); 2018; Vol. 101;.*
95. *COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS Chemicals Strategy for Sustainability Towards a Toxic-Free Environment; 2020;*
96. Endocrine Society. Common EDCs and Where They Are Found. Disponible online: <https://www.endocrine.org/topics/edc/what-edcs-are/common-edcs>).
97. Brotons, J.A.; Olea-Serrano, M.F.; Villalobos, M.; Pedraza, V.; Olea, N. Xenoestrogens Released from Lacquer Coatings in Food Cans. *Environ. Health Perspect.* 1995, *103*, 608–612.
98. Kang, J.-H.; Kito, K.; Kondo, F. Factors Influencing the Migration of Bisphenol A from Cans. *J. Food Prot.* 2003, *66*, 1444–1447, doi:10.4315/0362-028X-66.8.1444.
99. Brede, C.; Fjeldal, P.; Skjevraak, I.; Herikstad, H. Increased Migration Levels of Bisphenol A from Polycarbonate Baby Bottles after Dishwashing, Boiling and Brushing. *Food Addit. Contam.* 2003, *20*, 684–689, doi:10.1080/0265203031000119061.
100. Sonnenschein, C.; Soto, A.M. An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists11Proceedings of the 13th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology “Recent Advances

- in Steroid Biochemistry & Molecular Biology” Monaco 25–28 May 1997. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998, *65*, 143–150, doi:10.1016/S0960-0760(98)00027-2.
101. Fleisch, A.F.; Sheffield, P.E.; Chinn, C.; Edelstein, B.L.; Landrigan, P.J. Bisphenol A and Related Compounds in Dental Materials. *Pediatrics* 2010, *126*, 760–768, doi:10.1542/peds.2009-2693.
 102. Olea, N.; Pulgar, R.; Pérez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A.M.; Sonnenschein, C. Estrogenicity of Resin-Based Composites and Sealants Used in Dentistry. *Environ. Health Perspect.* 1996, *104*, 298–305, doi:10.1289/ehp.96104298.
 103. Pulgar, R.; Olea-Serrano, M.F.; Novillo-Fertrell, A.; Rivas, A.; Pazos, P.; Pedraza, V.; Navajas, J.M.; Olea, N. Determination of Bisphenol A and Related Aromatic Compounds Released from Bis-GMA-Based Composites and Sealants by High Performance Liquid Chromatography. *Environ. Health Perspect.* 2000, *108*, 21–27, doi:10.1289/ehp.0010821.
 104. Rudel, R.A.; Camann, D.E.; Spengler, J.D.; Korn, L.R.; Brody, J.G. Phthalates, Alkylphenols, Pesticides, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Other Endocrine-Disrupting Compounds in Indoor Air and Dust. *Environ. Sci. Technol.* 2003, *37*, 4543–4553, doi:10.1021/es0264596.
 105. Schlumpf, M.; Cotton, B.; Conscience, M.; Haller, V.; Steinmann, B.; Lichtensteiger, W. In Vitro and in Vivo Estrogenicity of UV Screens. *Environ. Health Perspect.* 2001, *109*, 239–244, doi:10.1289/ehp.01109239.
 106. Schlumpf, M.; Jarry, H.; Wuttke, W.; Ma, R.; Lichtensteiger, W. Estrogenic Activity and Estrogen Receptor β Binding of the UV Filter 3-Benzylidene Camphor: Comparison with 4-Methylbenzylidene Camphor. *Toxicology* 2004, *199*, 109–120, doi:10.1016/j.tox.2004.02.015.
 107. Hoppin, J.A.; Brock, J.W.; Davis, B.J.; Baird, D.D. Reproducibility of Urinary Phthalate Metabolites in First Morning Urine Samples. *Environ. Health Perspect.* 2002, *110*, 515–518, doi:10.1289/ehp.02110515.
 108. Frankowski, R.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Grześkowiak, T.; Sójka, K. The Presence of Bisphenol A in the Thermal Paper in the Face of Changing European Regulations – A Comparative Global Research. *Environ. Pollut.* 2020, *265*, 114879, doi:10.1016/j.envpol.2020.114879.

109. Cauley, J.A. Osteoporosis: Fracture Epidemiology Update 2016. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2017, 29, 150, doi:10.1097/BOR.0000000000000365.
110. Naranjo Hernández, A.; Díaz del Campo Fontecha, P.; Aguado Acín, M.P.; Arboleya Rodríguez, L.; Casado Burgos, E.; Castañeda, S.; Fiter Aresté, J.; Gifre, L.; Gómez Vaquero, C.; Candelas Rodríguez, G.; et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Reumatología sobre osteoporosis. *Reumatol. Clínica* 2019, 15, 188–210, doi:10.1016/j.reuma.2018.09.004.
111. Kang, J.-H.; Kondo, F.; Katayama, Y. Human Exposure to Bisphenol A. *Toxicology* 2006, 226, 79–89, doi:10.1016/j.tox.2006.06.009.
112. Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A.B.; Soriano, S.; García-Arévalo, M.; Ripoll, C.; Fuentes, E.; Quesada, I.; Nadal, Á. Bisphenol-A Acts as a Potent Estrogen via Non-Classical Estrogen Triggered Pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012, 355, 201–207, doi:10.1016/j.mce.2011.12.012.
113. PubChem. Bisphenol A. Disponible online: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623>.
114. Abraham, A.; Chakraborty, P. A Review on Sources and Health Impacts of Bisphenol A. *Rev. Environ. Health* 2020, 35, 201–210, doi:10.1515/reveh-2019-0034.
115. Wazir, U.; Mokbel, K. Bisphenol A: A Concise Review of Literature and a Discussion of Health and Regulatory Implications. *Vivo Athens Greece* 2019, 33, 1421–1423, doi:10.21873/invivo.11619.
116. Richter, C.A.; Birnbaum, L.S.; Farabollini, F.; Newbold, R.R.; Rubin, B.S.; Talsness, C.E.; Vandenberg, J.G.; Walser-Kuntz, D.R.; vom Saal, F.S. In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 2007, 24, 199–224, doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.004.
117. Liao, C.; Kannan, K. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 4655–4662, doi:10.1021/jf400445n.
118. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) Scientific Opinion on the Risks to Public Health Related to the Presence of Bisphenol A (BPA) in Foodstuffs. *EFSA J.* 2015, 13, 3978, doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.

119. Vandenberg, L.N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N.; Welshons, W.V. Human Exposure to Bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 2007, *24*, 139–177, doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010.
120. Calafat, A.M.; Ye, X.; Wong, L.-Y.; Reidy, J.A.; Needham, L.L. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-Tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 2008, *116*, 39–44, doi:10.1289/ehp.10753.
121. Lehmler, H.-J.; Liu, B.; Gadogbe, M.; Bao, W. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. *ACS Omega* 2018, *3*, 6523–6532, doi:10.1021/acsomega.8b00824.
122. Hiroi, H.; Tsutsumi, O.; Momoeda, M.; Takai, Y.; Osuga, Y.; Taketani, Y. Differential Interactions of Bisphenol A And17 β -Estradiol with Estrogen Receptor α (ER α) and ER β . *Endocr. J.* 1999, *46*, 773–778, doi:10.1507/endocrj.46.773.
123. Kurosawa, T.; Hiroi, H.; Tsutsumi, O.; Ishikawa, T.; Osuga, Y.; Fujiwara, T.; Inoue, S.; Muramatsu, M.; Momoeda, M.; Taketani, Y. The Activity of Bisphenol A Depends on Both the Estrogen Receptor Subtype and the Cell Type. *Endocr. J.* 2002, *49*, 465–471, doi:10.1507/endocrj.49.465.
124. Maduranga Karunarathne, W.A.H.; Choi, Y.H.; Park, S.R.; Lee, C.-M.; Kim, G.-Y. Bisphenol A Inhibits Osteogenic Activity and Causes Bone Resorption via the Activation of Retinoic Acid-Related Orphan Receptor α . *J. Hazard. Mater.* 2022, *438*, 129458, doi:10.1016/j.jhazmat.2022.129458.
125. Takayanagi, S.; Tokunaga, T.; Liu, X.; Okada, H.; Matsushima, A.; Shimohigashi, Y. Endocrine Disruptor Bisphenol A Strongly Binds to Human Estrogen-Related Receptor γ (ERR γ) with High Constitutive Activity. *Toxicol. Lett.* 2006, *167*, 95–105, doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.012.
126. Tohmé, M.; Prud'homme, S.M.; Boulahtouf, A.; Samarut, E.; Brunet, F.; Bernard, L.; Bourguet, W.; Gibert, Y.; Balaguer, P.; Laudet, V. Estrogen-Related Receptor γ Is an in Vivo Receptor of Bisphenol A. *FASEB J.* 2014, *28*, 3124–3133, doi:10.1096/fj.13-240465.
127. Nomiri, S.; Hoshyar, R.; Ambrosino, C.; Tyler, C.R.; Mansouri, B. A Mini Review of Bisphenol A (BPA) Effects on Cancer-Related Cellular Signaling Pathways. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019, *26*, 8459–8467, doi:10.1007/s11356-019-04228-9.

128. Bilancio, A.; Bontempo, P.; Donato, M.D.; Conte, M.; Giovannelli, P.; Altucci, L.; Migliaccio, A.; Castoria, G. Bisphenol A Induces Cell Cycle Arrest in Primary and Prostate Cancer Cells through EGFR/ERK/P53 Signaling Pathway Activation. *Oncotarget* 2017, *8*, 115620–115631, doi:10.18632/oncotarget.23360.
129. Cimmino, I.; Fiory, F.; Perruolo, G.; Miele, C.; Beguinot, F.; Formisano, P.; Oriente, F. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 5761, doi:10.3390/ijms21165761.
130. Murata, M.; Kang, J.-H. Bisphenol A (BPA) and Cell Signaling Pathways. *Biotechnol. Adv.* 2018, *36*, 311–327, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.002.
131. Legeay, S.; Faure, S. Is Bisphenol A an Environmental Obesogen? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2017, *31*, 594–609, doi:10.1111/fcp.12300.
132. Santangeli, S.; Maradonna, F.; Olivotto, I.; Piccinetti, C.C.; Gioacchini, G.; Carnevali, O. Effects of BPA on Female Reproductive Function: The Involvement of Epigenetic Mechanism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017, *245*, 122–126, doi:10.1016/j.ygcen.2016.08.010.
133. Ma, Y.; Liu, H.; Wu, J.; Yuan, L.; Wang, Y.; Du, X.; Wang, R.; Marwa, P.W.; Petlulu, P.; Chen, X.; et al. The Adverse Health Effects of Bisphenol A and Related Toxicity Mechanisms. *Environ. Res.* 2019, *176*, 108575, doi:10.1016/j.envres.2019.108575.
134. Pelch, K.; Wignall, J.A.; Goldstone, A.E.; Ross, P.K.; Blain, R.B.; Shapiro, A.J.; Holmgren, S.D.; Hsieh, J.-H.; Svoboda, D.; Auerbach, S.S.; et al. A Scoping Review of the Health and Toxicological Activity of Bisphenol A (BPA) Structural Analogues and Functional Alternatives. *Toxicology* 2019, *424*, 152235, doi:10.1016/j.tox.2019.06.006.
135. den Braver-Sewradj, S.P.; van Spronsen, R.; Hessel, E.V.S. Substitution of Bisphenol A: A Review of the Carcinogenicity, Reproductive Toxicity, and Endocrine Disruption Potential of Alternative Substances. *Crit. Rev. Toxicol.* 2020, *50*, 128–147, doi:10.1080/10408444.2019.1701986.
136. Huang, M.; Liu, S.; Fu, L.; Jiang, X.; Yang, M. Bisphenol A and Its Analogues Bisphenol S, Bisphenol F and Bisphenol AF Induce Oxidative Stress and Biomacromolecular Damage in Human Granulosa KGN Cells. *Chemosphere* 2020, *253*, 126707, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126707.

137. BOE-A-2023-628. Real Decreto 3/2023, de 10 de Enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. Disponible online: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2023-628>.
138. Juan-García, A.; Gallego, C.; Font, G. Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Rev. Toxicol.* 2015, 32, 144–160.
139. *Reglamento de Ejecución (UE) n.º 321/2011 de la Comisión, de 1 de abril de 2011, que modifica el Reglamento (UE) n.º 10/2011 por lo que respecta a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes. Texto pertinente a efectos del EEE*; 2011; Vol. 087.
140. *Reglamento (UE) 2018/213 de la Comisión, de 12 de febrero de 2018, sobre el uso de bisfenol A en los barnices y revestimientos destinados a entrar en contacto con los alimentos y por el que se modifica el Reglamento (UE) n.º 10/2011 por lo que respecta al uso de dicha sustancia en materiales plásticos en contacto con los alimentos (Texto pertinente a efectos del EEE.)*; 2018; Vol. 041;
141. Usman, A.; Ahmad, M. From BPA to Its Analogues: Is It a Safe Journey? *Chemosphere* 2016, 158, 131–142, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.070.
142. Rochester, J.R.; Bolden, A.L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* 2015, 123, 643–650, doi:10.1289/ehp.1408989.
143. Matsushima, A.; Liu, X.; Okada, H.; Shimohigashi, M.; Shimohigashi, Y. Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α but a Highly Specific Antagonist for ER β . *Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 1267–1272, doi:10.1289/ehp.0901819.
144. Rosenfeld, C.S. Neuroendocrine Disruption in Animal Models Due to Exposure to Bisphenol A Analogues. *Front. Neuroendocrinol.* 2017, 47, 123–133, doi:10.1016/j.yfrne.2017.08.001.
145. PubChem. 4,4'-Sulfonyldiphenol. Disponible online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6626>
146. Žalmanová, T.; Hošková, K.; Nevoral, J.; Adámková, K.; Kott, T.; Šulc, M.; Kotíková, Z.; Prokešová, Š.; Jílek, F.; Králíčková, M.; et al. Bisphenol S Negatively Affects the Meiotic Maturation of Pig Oocytes. *Sci. Rep.* 2017, 7, 485, doi:10.1038/s41598-017-00570-5.

147. Pal, S.; Sarkar, K.; Nath, P.P.; Mondal, M.; Khatun, A.; Paul, G. Bisphenol S Impairs Blood Functions and Induces Cardiovascular Risks in Rats. *Toxicol. Rep.* 2017, *4*, 560–565, doi:10.1016/j.toxrep.2017.10.006.
148. Qiu, W.; Yang, M.; Liu, S.; Lei, P.; Hu, L.; Chen, B.; Wu, M.; Wang, K.-J. Toxic Effects of Bisphenol S Showing Immunomodulation in Fish Macrophages. *Environ. Sci. Technol.* 2018, *52*, 831–838, doi:10.1021/acs.est.7b04226.
149. Thoene, M.; Dzika, E.; Gonkowski, S.; Wojtkiewicz, J. Bisphenol S in Food Causes Hormonal and Obesogenic Effects Comparable to or Worse than Bisphenol A: A Literature Review. *Nutrients* 2020, *12*, 532, doi:10.3390/nu12020532.
150. PubChem. 4,4'-Methylenediphenol. Disponible online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12111>.
151. Usman, A.; Ikhlas, S.; Ahmad, M. Occurrence, Toxicity and Endocrine Disrupting Potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A Mini-Review. *Toxicol. Lett.* 2019, *312*, 222–227, doi:10.1016/j.toxlet.2019.05.018.
152. Wang, R.; Fei, Q.; Liu, S.; Weng, X.; Liang, H.; Wu, Y.; Wen, L.; Hao, G.; Cao, G.; Jing, C. The Bisphenol F and Bisphenol S and Cardiovascular Disease: Results from NHANES 2013–2016. *Environ. Sci. Eur.* 2022, *34*, 4, doi:10.1186/s12302-021-00586-9.
153. Wagner, V.A.; Clark, K.C.; Carrillo-Sáenz, L.; Holl, K.A.; Velez-Bermudez, M.; Simonson, D.; Grobe, J.L.; Wang, K.; Thurman, A.; Solberg Woods, L.C.; et al. Bisphenol F Exposure in Adolescent Heterogeneous Stock Rats Affects Growth and Adiposity. *Toxicol. Sci.* 2021, *181*, 246–261, doi:10.1093/toxsci/kfab035.
154. PubChem. Bisphenol AF. Disponible online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864>
155. Theodore, A.N.; Carter III, R.O. Characterization of Fluoroelastomer Networks. I. Infrared Analysis. *J. Appl. Polym. Sci.* 1993, *49*, 1071–1080, doi:10.1002/app.1993.070490614.
156. Li, M.; Yang, Y.; Yang, Y.; Yin, J.; Zhang, J.; Feng, Y.; Shao, B. Biotransformation of Bisphenol AF to Its Major Glucuronide Metabolite Reduces Estrogenic Activity. *PLoS ONE* 2013, *8*, e83170, doi:10.1371/journal.pone.0083170.
157. Waidyanatha, S.; Mathews, J.M.; Patel, P.R.; Black, S.R.; Snyder, R.W.; Fennell, T.R. Disposition of Bisphenol AF, a Bisphenol A Analogue, in Hepatocytes in Vitro and in

Male and Female Harlan Sprague-Dawley Rats and B6C3F1/N Mice Following Oral and Intravenous Administration. *Xenobiotica* 2015, 45, 811–819, doi:10.3109/00498254.2015.1021732.

158. Lei, B.; Sun, S.; Zhang, X.; Feng, C.; Xu, J.; Wen, Y.; Huang, Y.; Wu, M.; Yu, Y. Bisphenol AF Exerts Estrogenic Activity in MCF-7 cells through Activation of Erk and PI3K/Akt Signals via GPER Signaling Pathway. *Chemosphere* 2019, 220, 362–370, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.122.
159. Marotta, V.; Russo, G.; Gambardella, C.; Grasso, M.; La Sala, D.; Chiofalo, M.G.; D'Anna, R.; Puzziello, A.; Docimo, G.; Masone, S.; et al. Human Exposure to Bisphenol AF and Diethylhexylphthalate Increases Susceptibility to Develop Differentiated Thyroid Cancer in Patients with Thyroid Nodules. *Chemosphere* 2019, 218, 885–894, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.084.
160. Karolinska Institutet, S., Institute of Environmental Medicine; Escrivá, L.; Hanberg, A.; Zilliacus, J.; Beronius, A. Assessment of the Endocrine Disrupting Properties of Bisphenol AF According to the EU Criteria and ECHA/EFSA Guidance. *EFSA J.* 2019, 17, e170914, doi:10.2903/j.efsa.2019.e170914.

JUSTIFICACIÓN

La evidencia científica muestra la presencia de los BPs, un tipo de EDC, en los distintos tejidos y fluidos corporales, atribuyéndoseles efectos nocivos para la salud. Algunos estudios han mostrado que el BPA puede alterar algunos parámetros funcionales del osteoblasto; si bien, los datos se limitan a un número muy escaso de estudios, que solo analizan algunos aspectos del osteoblasto y han sido realizados en osteoblastos de origen murino. Con respecto a otros BPs (BPF, BPS y BPAF), utilizados como sustitutos del BPA a nivel industrial, desconocemos la existencia de estudios que analicen su posible impacto sobre el osteoblasto. Por ello, consideramos que, dada la presencia continuada de EDCs como los BPs en el organismo desde edades muy tempranas, es pertinente investigar la actividad que presentan los BPs (BPA, BPS, BPF y BPAF) mediante análisis *in vitro* sobre distintos parámetros celulares de los osteoblastos humanos, lo cual podrá interferir con la calidad ósea a largo plazo.

HIPÓTESIS

Los EDCs como los BPs (BPA, BPF, BPS y BPAF), tienen un efecto nocivo sobre la fisiología del osteoblasto, al alterar parámetros como el crecimiento celular, la diferenciación/maduración, la síntesis de fosfatasa alcalina, la expresión de antígenos de superficie; así como la expresión génica de proteínas implicadas en los procesos de diferenciación/maduración del osteoblasto cuando las células se ven expuestas a dichas sustancias.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de los distintos BPs (BPA, BPS, BPF y BPAF) sobre la fisiología del osteoblasto, utilizando para ello cultivos primarios de osteoblastos humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar *in vitro* el efecto del BPA sobre el crecimiento y viabilidad celular, la capacidad fagocítica, la actividad ALP, la mineralización, el perfil antigénico (CD54, CD80 y CD86), la capacidad fagocítica y la expresión génica de los marcadores osteogénicos ALP, Col-1, OSC, Runx2, OSX, BMP-2 y BMP-7 en osteoblastos humanos primarios.

Determinar en osteoblastos humanos primarios en cultivo el efecto de los análogos del BPA (BPS, BPF y BPAF) sobre el crecimiento, y viabilidad celular, la actividad ALP y la mineralización.

Analizar *in vitro* el efecto de los análogos del BPA (BPS, BPF y BPAF) sobre la expresión génica de los marcadores osteogénicos ALP, Col-1, OSC, Runx2, OSX, BMP-2 y BMP-7 en osteoblastos humanos primarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO 1

Estudiar *in vitro* el efecto del BPA sobre el crecimiento y viabilidad celular, el perfil anti-génico, la capacidad fagocítica, la actividad ALP, la mineralización y la expresión génica de ALP, Col-1, OSC, Runx2, OSX, BMP-2 y BMP-7 en osteoblastos humanos primarios.

Abstract

Background: Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor that is widely present in the environment and exerts adverse effects on various body tissues. The objective of this study was to determine its repercussions on bone tissue by examining its impact on selected functional parameters of human osteoblasts.

Methods: Three human osteoblast lines were treated with BPA at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M.

Results: At 24 h post-treatment, a dose-dependent inhibition of cell growth, alkaline phosphatase activity, and mineralization were observed. The expression of CD54 and CD80 antigens was increased at doses of 10^{-5} and 10^{-6} M, while the phagocytic capacity and the expression of osteogenic genes (ALP, COL-1, OSC, RUNX2, OSX, BMP-2, and BMP-7) were significantly and dose-dependently reduced in the presence of BPA.

Conclusions: According to these findings, BPA exerts adverse effects on osteoblasts by altering their differentiation/maturation and their proliferative and functional capacity, potentially affecting bone health. Given the widespread exposure to this contaminant, further human studies are warranted to determine the long-term risk to bone health posed by BPA.

Keywords: Bisphenol A; osteoblast; bone tissue; cellular viability; cellular differentiation

1. Introduction

Bisphenol A (BPA), or 4,4'-(Propane-2,2-diyl) diphenol, is a chemical compound used as a major component in the manufacture of polycarbonate plastics, epoxy resins, and other polymeric materials, as well as in certain paper products. This material is employed in the manufacture of products of daily use in the home, including food containers, bottles, utensils, CDs, pens, and toys, among others. It is also used as a coating for food cans, water tanks, as an adjuvant in dental treatments, or as a material for medical devices. However, it is considered that the main route of entry into the human body for BPA is through food as a result of its contact with food containers or utensils¹⁻³. BPA is considered to be one of numerous endocrine disruptors, i.e., exogenous chemical substances that can hamper the functioning of hormones by binding to their receptors and/or interfering in their transportation due to their resemblance to the natural hormones^{4,5}. In this way, BPA can directly bind to different nuclear receptors, such as steroid and xenobiotic receptors (SXR) ⁶⁻⁸. In particular, the structural similarity between BPA and 17- β -estradiol (E2) allows it to act on the organism by binding to estrogen receptors α and β (ER α and ER β). BPA also binds to the non-classical estrogen receptor ER γ ⁹.

In addition, BPA has demonstrated the ability to interact with androgen, glucocorticoid, and thyroid hormone receptors¹⁰. In terms of pharmacokinetics, after absorption, BPA is rapidly metabolized to several inactive metabolites and free BPA is excreted mainly in the urine. Free BPA has been detected in the urine of adults and children, as well as in the serum of pregnant women, umbilical cord serum, and breast milk¹⁰. Thus, it has the ability to cross the blood-placental barrier and affect the intrauterine development of embryos and fetuses¹¹.

BPA is involved in the regulation of cancer cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis. It is also implicated in anti-cancer drug resistance through several signaling pathways activated by BPA binding to nuclear and membrane receptors such as ER $\alpha/\beta/\gamma$, androgen receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), among others¹⁰. Interaction with these receptors also appears to be responsible for BPA toxicity on the

reproductive system, interfering with breast formation, germ cell maturation, or placental adhesion to the endometrium. It could also affect inflammatory and immune responses by disrupting different cell signaling pathways mediated by cytokines and various immune cells, such as T and B lymphocytes, macrophages, mast cells, natural killers, or dendritic cells ¹².

BPA is known to act on two bone tissue populations, osteoblasts and osteoclasts. In the case of osteoblasts, the bone-forming cells, BPA has been found to inhibit their proliferative capacity. Thus, the in vitro treatment of osteoblasts of murine origin with BPA inhibited their proliferation and induced apoptosis, alkaline phosphatase (ALP) synthesis, calcium nodule formation, and the expression of RUNX2, Osterix, and β catenin genes ^{4,13,14}. With regard to osteoclasts, the cells responsible for bone resorption, in vitro BPA treatment has been associated with signs of apoptosis and inhibition of their maturation ¹⁴. Therefore, some studies suggest that BPA exposure can disrupt bone homeostasis in both the adult and the fetus ¹⁵. However, we must point out that the data are not conclusive since there are very few studies in human osteoblasts and the exact mechanism of action of BPA on this cell population is unknown.

The objective of this study was to explore the effect of BPA on selected osteoblast parameters by treating human osteoblasts obtained by primary culture with different BPA doses and determining the effect on their growth, differentiation/maturation, and function.

2. Results

2.1 Effect of BPA on Growth and Cellular Viability

Figure 1-A depicts the results obtained for the proliferative capacity of cultured human osteoblasts after 24 h of treatment with BPA doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M, showing an inhibitory effect on their capacity at all doses ($p < 0.0001$). The reduction versus controls ranged between 11.60 % and 17.53 %, obtaining the greatest effect at the highest dose (10^{-5} M). The apoptosis/necrosis assay showed that treatment with BPA increased the percentage of apoptotic cells in a dose-dependent manner, inhibiting the percentage of

viable cells. No changes were observed in relation to the percentage of necrotic cells (Figure 1-B).

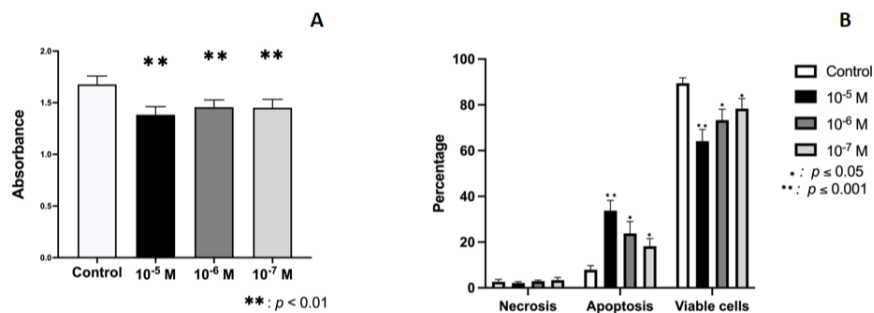


Fig. 1. Effect of BPA at different doses (10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M) on osteoblast growth and cellular viability in primary cell lines after 24 h of incubation. (A) Effect cellular proliferation. (B) Effect on induction of apoptosis/necrosis. Data are expressed as means \pm standard deviation. Significant differences *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$.

2.2 Effect off BPA on Antigenic Profile

The flow cytometry results depicted in Figure 2 show that the expression of CD54 and CD80 antigens was significantly increased versus controls after 24 h treatment with BPA at doses of 10^{-5} and 10^{-6} M but was not modified at the lowest dose. No significant change in the expression of CD86 antigen was observed after treatment with any dose.

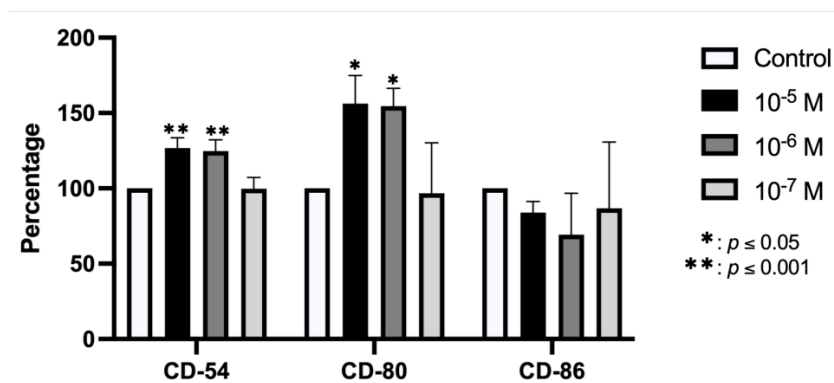


Fig. 2. Expression of CD54, CD80, and CD86 in cells treated for 24 h with BPA (10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M) Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant differences *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$.

2.3 Effect of BPA on ALP Synthesis

Data depicted in Figure 3 show that the ALP activity of osteoblasts was significantly reduced after 24 h of treatment with BPA at all doses (10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} M), obtaining the greatest effect at the highest dose.

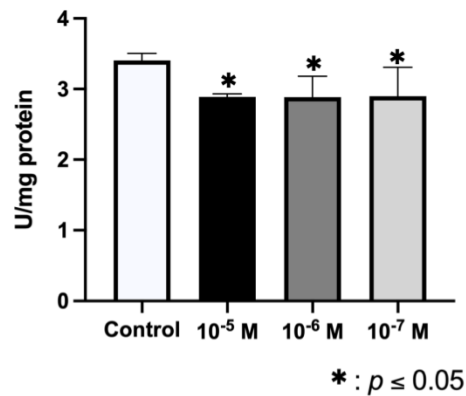


Fig. 3. ALP activity of primary cell lines after 24 h of treatment with BPA at different doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M. The activity was determined in cell lysates and normalized to total cellular protein (U/mg of proteins). Data are reported as means \pm standard deviation. Significant differences * $p < 0.05$.

2.4 Effect of BPA on In Vitro Mineralization

Figure 4 depicts the results for nodule mineralization of the osteoblasts obtained at 7, 14, and 21 days after culture with BPA at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} M for 24 h. No change in mineralization versus controls was observed at day 7 post-treatment, but there was a significant dose-dependent inhibition of mineralization at days 14 and 21.

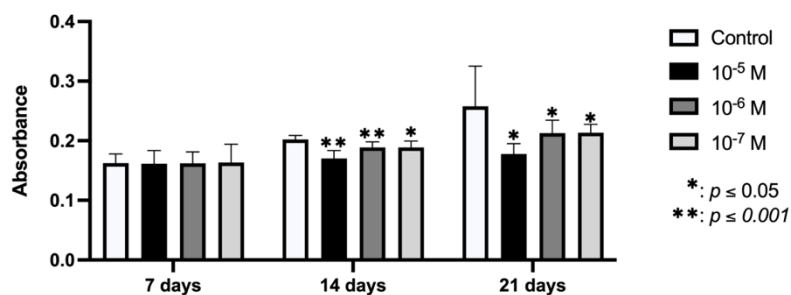


Fig. 4. Quantitative study of mineralization of primary cell lines through nodule formation, after culture in osteogenic medium supplemented with BPA (10^{-5} , 10^{-6} , or

10⁻⁷ M). Data are reported as means of absorbance ± standard deviation. Significant differences * *p* < 0.05; ** *p* < 0.001.

2.5 Effect of BPA on Phagocytic Capacity

Figure 5 shows that the phagocytic capacity of osteoblasts cultured for 24 h with BPA (10⁻⁵, 10⁻⁶, or 10⁻⁷ M) was significantly inhibited versus controls in a dose-dependent manner.

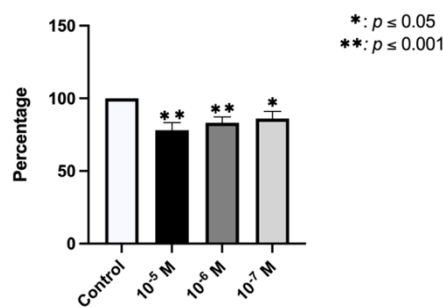


Fig. 5. Phagocyte capacity of osteoblasts cell lines after treatment with BPA at different doses of 10⁻⁵, 10⁻⁶, or 10⁻⁷ M determined by means of flow cytometry. The data are expressed as the mean of the percentage of cells positive for phagocytosis with respect to control group ± standard deviation. Significant differences * *p* < 0.05; ** *p* < 0.001.

2.6 Effect of BPA on Gene Expression

In general, gene expression of the studied osteogenic markers decreased in human osteoblasts cultured in the presence of BPA for 24 h (Figure 6). Treatment significantly reduced the expression of COL-1, RUNX2, OSX, and BMP-7 at all three doses but only reduced the expression of ALP, OSC, and BMP-2 at the higher doses (10⁻⁵ and 10⁻⁶M).

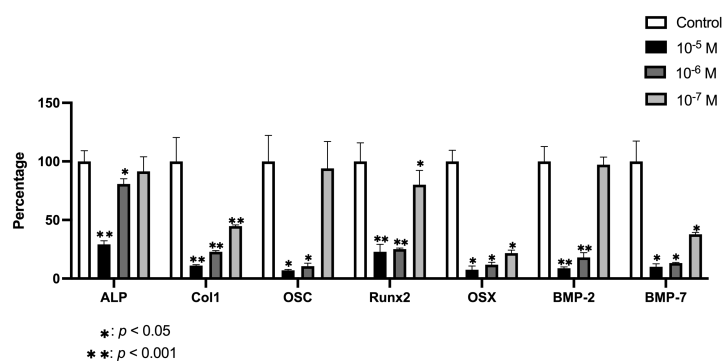


Fig. 6. Expression of osteoblast genes (ALP, COL-1, OSC, RUNX2, OSX, BMP-2, and BMP-7) treated for 24 h with BPA at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M. The data are expressed as the mean of expression percentage with respect to control group \pm standard deviation. Significant differences *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$.

3. Discussion

In this in vitro study, treatment with BPA inhibited the proliferative capacity by apoptosis induction and cell differentiation of human osteoblasts obtained by primary culture and modified their antigen and gene expression. Given the key role of osteoblasts in bone physiology, these results suggest that BPA exerts adverse effects on bone, in line with reports of the negative impact of this endocrine disruptor on many other human tissues^{16,17,18}. These findings are in line with previous observations in mouse¹⁴ and human fetal¹⁹ osteoblast cell lines. This is the first study to examine these effects in human osteoblasts obtained by primary culture.

BPA demonstrated a dose-dependent inhibitory effect on osteoblast proliferative capacity by inducing apoptosis at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} M. Hwang *et al.*, 2013, also observed that BPA at concentrations of 2.5–12.5 μ M inhibited the growth of MC3T3-E1 mouse cells by apoptosis, which was stimulated at 24 h by caspase activation; however, they detected no effects on cell viability at a concentration of 0.5 μ M, the lowest dose studied. In their study of the human fetal osteoblast cell line hFOB1.19, Thent *et al.* (2018) reported that a concentration of 12.5 μ g/mL BPA was necessary to reduce cell viability by 50 % at 24 h. Cadmium, another endocrine disruptor, also demonstrated an anti-proliferative effect on human osteoblasts at 24 h of treatment²⁰. Given that osteoblasts are responsible for generating new bone tissue in the complex and continuous process of bone remodeling, inhibition of their proliferative capacity may have severe consequences, potentially leading to the loss of bone mass and density^{21,22,23}.

The results obtained for ALP activity and mineralization also indicate a negative effect of BPA on bone matrix formation. ALP synthesis increases concentrations of calcium and phosphorus in the bone matrix, and its reduction would be involved in the inhibition of mineralization detected at 14 and 21 days of treatment²⁴. Contradictory results have been obtained for the MC3T3-E1 mouse cell line, with one study finding that BPA treatment reduced ALP activity and calcium nodule formation¹⁴ and another that it increased

ALP activity and bone mineralization ²⁵. Mineralization provides bone with rigidity and resistance, and its alteration can therefore have a negative impact on bone density and quality ²⁶.

In the present study, BPA treatment was associated with a decreased expression of CD54 and CD80 surface antigens, which can also be modulated by cytokines, growth factors, platelet-rich plasma, bacterial lipopolysaccharides, phenolic compounds, and certain pharmaceuticals; reduced expression of these markers has been associated with the maturation/differentiation of osteoblasts and their elevated expression with suppression of their differentiation ^{27, 28, 29, 30}. These alterations in the expression of CD54 and CD80 are consistent with the inhibition by BPA of ALP synthesis and mineralization in osteoblasts, which suggests a suppression of their maturation. BPA was also found to inhibit the phagocytic capacity of osteoblasts, which is known to be altered by their in vitro treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs, laser radiation, or phenolic compounds ^{27,28,29}.

BPA treatment also inhibited the expression of ALP, COL-1, OSC, RUNX2, OSX, BMP-2, and BMP-7, osteogenic markers related to osteoblastogenesis and osteoblast function ³¹. The presence of BPA was previously found to inhibit the expression of RUNX2 and OXS and the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the MC3T3-E1 mouse cell line, suggesting the inhibition of osteoblast differentiation and therefore of bone formation ¹⁴. The reduced expression of RUNX2 and OSX observed in the present study would be related to a change in differentiation, while the reduced expression of ALP, COL-1, OSC, BMP-2, and BMP-7 would indicate a negative effect not only on the maturation of osteoblasts but also on their functional capacity.

Caution should be taken in evaluating the potential clinical relevance of these in vitro results. Nevertheless, similar findings have led to confirmation of the clinical impact of BPA exposure on other body tissues, such as adipose tissue, placenta, sperm, and mammary glands, among others ^{32,33}. There is an urgent need to develop novel approaches to the prevention and therapy of bone disease, especially osteoporosis, considered a pandemic by the WHO ³⁴ and largely attributed to an imbalance in bone remodeling ^{35,36}. In this sense, some authors have shown that olive leaf extracts, rich in phenolic compounds such as hydroxytyrosol or oleuropein, have effects against metabolic disorders induced by BPA by improving the antioxidant defense system and regulating important activities

of pathways signaling³⁷. Hence, further research is warranted to verify the effect of BPA exposure on osteoclasts and osteoblasts, which mediate the resorption and formation of bone, respectively.

4. Materials and Methods

4.1. Chemical

BPA (C₁₅H₁₆O₂) was purchased from Sigma-Aldrich (Co., St. Louis, MO, USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO); the final concentration of DMSO never exceeded 0.05 %.

4.2. Primary Human Osteoblasts

Primary human osteoblasts were obtained from bone chips gathered during routine mandibular osteotomy or lower wisdom tooth extraction in healthy patients at the Clinic of the School of Dentistry of the University of Granada. All study procedures were carried out in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All participants signed informed consent for participation in the study, which was approved by the Ethical Committee of the University of Granada (Reg. No. 523/CEIH/2018). Bone samples were independently processed, with thorough washing of fragments four times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) to remove bone marrow and periosteum remains. The bone fragments were then seeded into culture flasks and cultured according to a previously reported protocol³⁸. Finally, three primary osteoblast cell lines were established.

4.3. Treatments

The osteoblast cells obtained were treated for 24 h with BPA at doses of 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, or 10⁻⁷ M; untreated cells served as controls.

4.4. Cell Proliferation

The MTT method was used to determine cell proliferation³⁹. Osteoblasts were seeded at 1×10^4 cells/mL per well into a 96-well plate (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂ for 24 h in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) with 20 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Paisley, UK). The medium was then replaced with DMEM containing BPA at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M. At 24 h, the medium was replaced with phenol-red-free DMEM containing 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated for 4 h. Cellular reduction of the MTT tetrazolium ring resulted in the formation of a dark-purple water-insoluble deposit of formazan crystals. After incubation, the medium was aspirated and DMSO was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured with a spectrophotometer at 570 nm (Sunrise™, Tecan, Männedorf, Switzerland).

4.5. Apoptosis and Necrosis Analysis

Cultured human osteoblast cells treated with 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M for 24 h and untreated control cells were detached from the culture flask, washed, suspended in 300 µL PBS, and then labeled with annexin V and PI (Immunostep S.L., Salamanca, Spain), incubating 100 µL aliquots of the cell suspension with 5 µL annexin V and 5 µL PI for 15 min at room temperature in the dark. Cells were then washed, suspended in 500 µL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer with argon laser (Facs Vantage Becton Dickinson, Palo Alto, Santa Clara, CA, USA) at a wavelength of 488 nm to determine the percentage of fluorescent cells. We calculated the percentage of annexin-positive (apoptotic) cells and PI-positive (necrotic) cells from counts of 2000–3000 cells⁴⁰.

4.6. Antigenic Phenotype

The antigenic phenotype was studied by flow cytometry at 24 h of culture with 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M BPA; untreated cells served as controls. Cells were detached from the culture flask with 0.4 % (w/v) EDTA solution, washed, and suspended in PBS at $2 \times$

10⁴ cells/mL. Cells were labeled by direct staining with monoclonal antibodies (MAbs) CD54 (ICAM-1 MAb [MEM-111], FICT), CD80 (human CD80 [B7-1, BB1], FICT) and CD86 (human CD86 [B7-2, B70], FICT) from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain. Cells were then analyzed by flow cytometry (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, CA) as described by ²⁷.

4.7. ALP Activity

ALP activity was quantified using a colorimetric assay (diagnostic kit 104-LL; Sigma) as described by ²⁹. Primary osteoblasts cultured in non-osteogenic medium and treated with BPA at the above-reported doses or untreated (controls) were seeded at 1 × 10⁴ cells/mL per well into 24-well plates and cultured for 24 h under standard conditions. Standards of p-nitrophenol (0 to 250 µmol/L) were prepared from dilutions of a 1000 µmol/L stock solution and assayed in parallel. Next, cells were lysed with 0.1 % (v/v) Triton X-100 at 37 °C, and the cell lysate was removed in a known volume of buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.8 and 0.5 mM MgCl₂. ALP activity was determined using the p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) liquid substrate system (Sigma), which measures the formation of yellow p-NP from p-NPP as catalyzed by ALP. Briefly, 50 µL of cell lysate solution was added to the ALP substrate and incubated at 37 °C for 45 min; next, 50 µL of NaOH 0.1 mol/L was added in each sample to stop the enzymatic reaction, and a final absorbance measurement was taken at 405 nm with an ELx800 spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). Total protein content was estimated by the Bradford method using a protein assay kit from Bio-Rad Laboratories (Nazareth-Eke, Belgium). ALP activity was expressed as U/mg protein. Results of each assay were compared with those for untreated cells grown under the same conditions.

4.8. Mineralization Assay

Cells were cultured in DMEM with ascorbic acid (0.05 mM) and β-glycerol phosphate (5 mM). At 7, 14, and 21 days, the plate with cells and the precipitated calcium incorporated in the cell matrix were stained with alizarin red S (2 %). The dye present in mineralization nodules was extracted for 15 min with 10 % (w/v) cetylpyridinium chloride

in 10 mM sodium phosphate (pH 7.0). The extracted stain was then transferred to a 96-well plate and the absorbance at 562 nm was measured with a spectrophotometer (ELx800, BioTek) as previously described ⁴¹.

4.9. Phagocytic Activity

Flow cytometry was used to study the phagocytic activity of osteoblasts cultured for 24 h with BPA (10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M) or without BPA (controls). Cells were detached from the culture flask using a solution of 0.05 % (w/v) trypsin and 0.02 % (w/v) EDTA, washed, and suspended in complete culture medium with 10 % (v/v) FBS at 2×10^4 cells/mL. Cells were labeled by direct staining with labeled latex beads, incubating 100 μ L of cell suspension with 2 μ L of carboxylated FICT-labeled latex beads with diameter of 2 μ m (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 30 min at 37 °C in darkness. Cells were washed, suspended in 1 mL of PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, Santa Clara, CA, USA). Results were expressed as the percentage of cells positive for phagocytosis with respect to control group.

4.10. Gene Expression Analysis

Gene expression was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) as described by [42]. After 24 h of culture with or without BPA (controls), cells were detached from the culture flask using 0.05 % trypsin-EDTA solution (Sigma) and individually harvested. Messenger RNA (mRNA) was extracted by a silicate gel technique in the QiagenRNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), which includes a DNase digestion step. The amount of extracted mRNA was measured by UV spectrophotometry at 260 nm (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), determining contamination with proteins according to the 260/280 ratio. An equal amount of RNA (1 μ g of total RNA in 40 μ L of total volume) was reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Primers were designed using the NCBI-nucleotide library and Primer design (Table 1) to detect mRNA of ALP, COL-1, OSC, RUNX2, OSX, BMP-2, and BMP-7. All were matched

to the mRNA sequences of target genes (NCBI Blast software). Final results were normalized as proposed by Ragni *et al.* (2013). Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) was performed using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories) in accordance with the manufacturer's protocols. Samples were amplified in 96-well microplates in an IQ5-Cycler (Bio-Rad laboratories) using an annealing temperature (specific for each gene) ranging from 60 °C to 65 °C and an elongation temperature of 72 °C over 40 cycles. PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µL, with 5 µL of cDNA sample and 2 µL of each primer. For the negative control, water was used instead of mRNA samples. Standard curves were constructed for each target gene by plotting Ct values against log cDNA dilution. After each RT-PCR, a melting profile was created and agarose gel electrophoresis of each sample was carried out to rule out nonspecific PCR products and primer dimers. The relative quantification of gene expression was determined using the comparative Ct method. For each gene, the mRNA concentration was expressed in ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNAs. The cDNA from individual cell experiments was analyzed in triplicate RT-PCR studies. The data were expressed as the percentage of expression with respect to control group.

Gene	Sense primer	Antisense primer	Amblicon (bp)
ALP	5'-CCCATATTCCTGCACTTTG-3'	5'-ACCTTGACCTCTCAGCCTCA-3'	195
Col-1	5'-CCTCATCGCAGGAGAAAAAG-3'	5'-CCCTGAAGTGACTGGGGTAA-3'	169
OSC	5'-CCTGGTCCAGACCACAGAGT-3'	5'-TGGAGATTTTGGGAGTACGG-3'	194
Runx2	5'-CCTTGCTGCTCTACCTCCAC-3'	5'-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'	197
OSX	5'-TGCCTAGAAGCCCTGAGAAA-3'	5'-TTTAACTTGGGGCCTGAGA-3'	205
BMP-2	5'-TCGAAATTCCTCCGTGACCAG-3'	5'-CCACTTCCACCACGAATCCA-3'	142
BMP-7	5'-CTGGTCTTTGTCTGCAGTGG-3'	5'-GTACCCCTCAACAAGGCTTC-3'	202

Table 1. Primer sequences for the amplification of cDNA by real-time PCR.

4.11. Statistical Analysis

SPSS version 24.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) was used for the statistical analysis. Each experiment was performed in triplicate for each culture. Results were expressed

as means \pm SD, and the Kolmogorov–Smirnov test was applied to evaluate the normality of variable distributions. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed, applying the Bonferroni correction. $p < 0.05$ was considered significant. All data were analyzed in relation to the control group.

5. Conclusions

These in vitro findings confirm the significant adverse effects of BPA on human osteoblasts. Exposure inhibits their growth, differentiation, and function through decreases in ALP synthesis and mineralization and changes in antigen expression and phagocytic capacity, closely related to alterations in gene expression. These results support the need to prevent the exposure of humans to this toxic pollutant, which is widely present in the environment and the home^{32,43}. Our results contribute to explaining the increase in the prevalence of bone pathologies, such as osteoporosis, as a consequence of the high exposure of the population to this endocrine disruptor. However, further in vitro and in vivo research is needed to verify the repercussions of long-term exposure to BPA on bone health.

6. References

1. Dodson, R.E.; Setzer, R.W.; Spengler, J.D.; Brody, J.G.; Rudel, R.A.; Cedeño Laurent, J.G. Influence of Living in the Same Home on Biomonitoring Levels of Consumer Product Chemicals. *J. Exp. Sci Environ. Epidemiol.* 2021.
2. Sathyanarayana, S.; Alcedo, G.; Saelens, B.E.; Zhou, C.; Dills, R.L.; Yu, J.; Lanphear, B. Unexpected Results in a Randomized Dietary Trial to Reduce Phthalate and Bisphenol A Exposures. *J. Exp. Sci Environ. Epidemiol.* 2013, *23*, 378–384.
3. Bisphenol A | EFSA. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>
4. Thent, Z.C.; Froemming, G.R.A.; Muid, S. Bisphenol A Exposure Disturbs the Bone Metabolism: An Evolving Interest towards an Old Culprit. *Life Sci.* 2018, *198*, 1–7.
5. World Health Organization, United Nations Environment Programme, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals; Bergman, Å.;

- Heindel, J.J. *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012: Summary for Decision-Makers*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.
6. Krüger, T.; Long, M.; Bonefeld-Jørgensen, E.C. Plastic Components Affect the Activation of the Aryl Hydrocarbon and the Androgen Receptor. *Toxicology* 2008, *246*, 112–123.
 7. Matsushima, A.; Kakuta, Y.; Teramoto, T.; Koshiba, T.; Liu, X.; Okada, H.; Tokunaga, T.; Kawabata, S.-I.; Kimura, M.; Shimohigashi, Y. Structural Evidence for Endocrine Disruptor Bisphenol A Binding to Human Nuclear Receptor ERR. *J. Biochem.* 2007, *142*, 517–524.
 8. Vrzal, R.; Zenata, O.; Dorcakova, A.; Dvorak, Z. Environmental Pollutants Parathion, Paraquat and Bisphenol A Show Distinct Effects towards Nuclear Receptors-Mediated Induction of Xenobiotics-Metabolizing Cytochromes P450 in Human Hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 2015, *238*, 43–53.
 9. Bolli, A.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P.; Del Pozzo, G.; Manco, I.; Vietri, M.T.; Mita, L.; Altucci, L.; Mita, D.G.; Marino, M. Laccase Treatment Impairs Bisphenol A-Induced Cancer Cell Proliferation Affecting Estrogen Receptor Alpha-Dependent Rapid Signals. *IUBMB Life* 2008, *60*, 843–852.
 10. Murata, M.; Kang, J.-H. Bisphenol A (BPA) and Cell Signaling Pathways. *Biotechnol. Adv.* 2018, *36*, 311–327.
 11. Yaglova, N.V.; Yaglov, V.V. Endocrine Disruptors as a New Etiologic Factor of Bone Tissue Diseases (Review). *Sovrem Tekhnologii Med.* 2021, *13*, 84–94.
 12. Araiza, V.H.D.R.; Mendoza, M.S.; Castro, K.E.N.; Cruz, S.M.; Rueda, K.C.; de Leon, C.T.G.; Morales Montor, J. Bisphenol A, an Endocrine-Disruptor Compound, That Modulates the Immune Response to Infections. *Front. Biosci.* 2021, *26*, 346–362.
 13. Chin, K.-Y.; Pang, K.-L.; Mark-Lee, W.F. A Review on the Effects of Bisphenol A and Its Derivatives on Skeletal Health. *Int. J. Med. Sci.* 2018, *15*, 1043–1050.
 14. Hwang, J.K.; Min, K.H.; Choi, K.H.; Hwang, Y.C.; Jeong, I.-K.; Ahn, K.J.; Chung, H.-Y.; Chang, J.S. Bisphenol A Reduces Differentiation and Stimulates Apoptosis of Osteoclasts and Osteoblasts. *Life Sci.* 2013, *93*, 367–372.

15. Miki, Y.; Hata, S.; Nagasaki, S.; Suzuki, T.; Ito, K.; Kumamoto, H.; Sasano, H. Steroid and Xenobiotic Receptor-Mediated Effects of Bisphenol A on Human Osteoblasts. *Life Sci.* 2016, *155*, 29–35.
16. Adoamnei, E.; Mendiola, J.; Vela-Soria, F.; Fernández, M.F.; Olea, N.; Jørgensen, N.; Swan, S.H.; Torres-Cantero, A.M. Urinary Bisphenol A Concentrations Are Associated with Reproductive Parameters in Young Men. *Environ. Res.* 2018, *161*, 122–128.
17. Ma, Y.; Liu, H.; Wu, J.; Yuan, L.; Wang, Y.; Du, X.; Wang, R.; Marwa, P.W.; Petlulu, P.; Chen, X.; *et al.* The Adverse Health Effects of Bisphenol A and Related Toxicity Mechanisms. *Environ. Res.* 2019, *176*, 108575.
18. Pelch, K.; Wignall, J.A.; Goldstone, A.E.; Ross, P.K.; Blain, R.B.; Shapiro, A.J.; Holmgren, S.D.; Hsieh, J.-H.; Svoboda, D.; Auerbach, S.S.; *et al.* A Scoping Review of the Health and Toxicological Activity of Bisphenol A (BPA) Structural Analogues and Functional Alternatives. *Toxicology* 2019, *424*, 152235.
19. Thent, Z.C.; Froemming, G.R.A.; Ismail, A.B.M.; Fuad, S.B.S.A.; Muid, S. Employing Different Types of Phytoestrogens Improve Bone Mineralization in Bisphenol A Stimulated Osteoblast. *Life Sci.* 2018, *210*, 214–223.
20. Papa, V.; Bimonte, V.M.; Wannenes, F.; D'Abusco, A.S.; Fittipaldi, S.; Scandurra, R.; Politi, L.; Crescioli, C.; Lenzi, A.; Di Luigi, L.; *et al.* The Endocrine Disruptor Cadmium Alters Human Osteoblast-like Saos-2 Cells Homeostasis in Vitro by Alteration of Wnt/ β -Catenin Pathway and Activation of Caspases. *J. Endocrinol. Investig.* 2015, *38*, 1345–1356.
21. Boyce, B.F.; Zuscik, M.J.; Xing, L. Chapter 11—Biology of Bone and Cartilage. In *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*, 2nd ed.; Thakker, R.V., Whyte, M.P., Eisman, J.A., Igarashi, T., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 173–195. ISBN 978-0-12-804182-6.
22. Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I. Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, *1092*, 385–396.
23. Xiao, W.; Wang, Y.; Pacios, S.; Li, S.; Graves, D.T. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front. Oral Biol.* 2016, *18*, 9–16.
24. Jayakumar, P.; Di Silvio, L. Osteoblasts in Bone Tissue Engineering. *Proc. Inst. Mech. Eng. H* 2010, *224*, 1415–1440.

25. Kanno, S.; Hirano, S.; Kayama, F. Effects of Phytoestrogens and Environmental Estrogens on Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Toxicology* 2004, *196*, 137–145.
26. Seeman, E.; Delmas, P.D. Bone Quality—the Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *N. Engl. J. Med.* 2006, *354*, 2250–2261.
27. De Luna-Bertos, E.; Ramos-Torrecillas, J.; Garcia-Martinez, O.; Guildford, A.; Santin, M.; Ruiz, C. Therapeutic Doses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Osteosarcoma MG-63 Osteoblast-Like Cells Maturation, Viability, and Biomineralization Potential. *Sci. World J.* 2013, *2013*, 809891.
28. Garcia-Martinez, O.; Reyes-Botella, C.; Diaz-Rodriguez, L.; De Luna-Bertos, E.; Ramos-Torrecillas, J.; Francisco Vallecillo-Capilla, M.; Ruiz, C. Effect of Platelet-Rich Plasma on Growth and Antigenic Profile of Human Osteoblasts and Its Clinical Impact. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2012, *70*, 1558–1564.
29. Melguizo-Rodriguez, L.; Ramos-Torrecillas, J.; Javier Manzano-Moreno, F.; Illescas-Montes, R.; Rivas, A.; Ruiz, C.; De Luna-Bertos, E.; Garcia-Martinez, O. Effect of Phenolic Extracts from Different Extra-Virgin Olive Oil Varieties on Osteoblast-like Cells. *PLoS ONE* 2018, *13*, e0196530.
30. Pérez, E.; García-Martínez, O.; Arroyo-Morales, M.; Reyes-Botella, C.; Ruiz, C. Modulation of Antigenic Phenotype in Cultured Human Osteoblast-like Cells by FGFb, TGFbeta1, PDGF-BB, IL-2, IL-1beta, LPS and IFNgamma. *Biosci. Rep.* 2006, *26*, 281–289.
31. Zuo, C.; Huang, Y.; Bajis, R.; Sahih, M.; Li, Y.-P.; Dai, K.; Zhang, X. Osteoblastogenesis Regulation Signals in Bone Remodeling. *Osteoporos. Int.* 2012, *23*, 1653–1663.
32. Abraham, A.; Chakraborty, P. A Review on Sources and Health Impacts of Bisphenol A. *Rev. Environ. Health* 2020, *35*, 201–210.
33. Den Braver-Sewradj, S.P.; van Spronsen, R.; Hessel, E.V.S. Substitution of Bisphenol A: A Review of the Carcinogenicity, Reproductive Toxicity, and Endocrine Disruption Potential of Alternative Substances. *Crit. Rev. Toxicol.* 2020, *50*, 128–147.
34. Clynes, M.A.; Harvey, N.C.; Curtis, E.M.; Fuggle, N.R.; Dennison, E.M.; Cooper, C. The Epidemiology of Osteoporosis. *Br. Med. Bull.* 2020, *133*, 105–117.

35. Cauley, J.A. Osteoporosis: Fracture Epidemiology Update 2016. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2017, *29*, 150–156.
36. Föger-Samwald, U.; Dovjak, P.; Azizi-Semrad, U.; Kersch-Schindl, K.; Pietschmann, P. Osteoporosis: Pathophysiology and Therapeutic Options. *EXCLI J.* 2020, *19*, 1017–1037.
37. Mahmoudi, A.; Hadrich, F.; Feki, I.; Ghorbel, H.; Bouallagui, Z.; Marrekchi, R.; Fourati, H.; Sayadi, S. Oleuropein and Hydroxytyrosol Rich Extracts from Olive Leaves Attenuate Liver Injury and Lipid Metabolism Disturbance in Bisphenol A-Treated Rats. *Food Funct.* 2018, *9*, 3220–3234.
38. Garcia-Martinez, O.; Diaz-Rodriguez, L.; Rodriguez-Perez, L.; De Luna-Bertos, E.; Reyes Botella, C.; Concepcion Ruiz, C. Effect of Acetaminophen, Ibuprofen and Methylprednisolone on Different Parameters of Human Osteoblast-like Cells. *Arch. Oral Biol.* 2011, *56*, 317–323.
39. Illescas-Montes, R.; Melguizo-Rodríguez, L.; Manzano-Moreno, F.J.; García-Martínez, O.; Ruiz, C.; Ramos-Torrecillas, J. Cultured Human Fibroblast Biostimulation Using a 940 Nm Diode Laser. *Materials* 2017, *10*, 793.
40. Costela-Ruiz, V.J.; Melguizo-Rodríguez, L.; Illescas-Montes, R.; Ramos-Torrecillas, J.; Manzano-Moreno, F.J.; Ruiz, C.; Bertos, E.D.L.-. Effects of Therapeutic Doses of Celecoxib on Several Physiological Parameters of Cultured Human Osteoblasts. *Int. J. Med. Sci.* 2019, *16*, 1466–1472.
41. Manzano-Moreno, F.J.; Ramos-Torrecillas, J.; De Luna-Bertos, E.; Reyes-Botella, C.; Ruiz, C.; García-Martínez, O. Nitrogen-Containing Bisphosphonates Modulate the Antigenic Profile and Inhibit the Maturation and Biomineralization Potential of Osteoblast-like Cells. *Clin. Oral. Investig.* 2015, *19*, 895–902.
42. Manzano-Moreno, F.J.; Ramos-Torrecillas, J.; Melguizo-Rodríguez, L.; Illescas-Montes, R.; Ruiz, C.; García-Martínez, O. Bisphosphonate Modulation of the Gene Expression of Different Markers Involved in Osteoblast Physiology: Possible Implications in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Int. J. Med. Sci.* 2018, *15*, 359–367.
43. Fromme, H.; Küchler, T.; Otto, T.; Pilz, K.; Müller, J.; Wenzel, A. Occurrence of Phthalates and Bisphenol A and F in the Environment. *Water Res.* 2002, *36*, 1429–1438.

OBJETIVO 2

Determinar *in vitro* el efecto de los análogos del BPA (BPS, BPF y BPAF) sobre el crecimiento, y viabilidad celular, la actividad ALP y la mineralización en osteoblastos humanos primarios.

Abstract

Bisphenol A (BPA) analogs, like BPA, could have adverse effects on human health including bone health. The aim was to determine the effect of BPF, BPS and BPAF on the growth and differentiation of cultured human osteoblasts. Osteoblasts primary culture from bone chips harvested during routine dental work and treated with BPF, BPS, or BPAF for 24 h at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} M. Next, cell proliferation was studied, apoptosis induction, and alkaline phosphatase (ALP) activity. In addition, mineralization was evaluated at 7, 14, and 21 days of cell culture in an osteogenic medium supplemented with BP analog at the studied doses. BPS treatment inhibited proliferation in a dose-dependent manner at all three doses by inducing apoptosis; BPF exerted a significant inhibitory effect on cell proliferation at the highest dose alone by an increase of apoptosis; while BPAF had no effect on proliferation or cell viability. Cell differentiation was adversely affected by treatment with BPA analogs in a dose-dependent, observing a reduction in calcium nodule formation at 21 days. According to the results obtained, these BPA analogs could potentially pose a threat to bone health, depending on their concentration in the organism.

Keywords Bisphenol F · Bisphenol S · Bisphenol AF · Osteoblast · Cellular viability · Cellular differentiation.

1. Introduction

Exposure to bisphenol A (BPA) has been associated with numerous diseases (e.g., cancer, obesity, and reproductive health disorders) due to its action as an endocrine disruptor¹⁻⁴. This highly ubiquitous toxin is found in a wide range of items of daily use, being commonly employed in the manufacture of containers, utensils, and food packaging, among many other products⁵⁻⁷. Hence, humans are in virtually continuous contact with this molecule^{5,8}. Evidence of the elevated toxicity and environmental ubiquity of BPA has prompted measures aimed at its elimination. These included prohibition by the European Commission of its utilization in baby bottles⁹ and thermal paper¹⁰. A recent European Food Safety Authority (EFSA) draft opinion has proposed to lower the tolerable daily intake of BPA from 4 µg/kg/day to 0.04 ng/kg/day, therefore potential health risks need to be addressed¹¹. Legislative action and consumer pressure have led to the widespread replacement of BPA by its analogs, including BPF, BPS, and BPAF. However, these have been reported to have comparable endocrine disrupting effects to those of BPA, with similar possible health repercussions¹²⁻¹⁴.

Endocrine disruptors can interfere with bone homeostasis by causing a hormonal imbalance, by exerting a direct toxic effect on osteoblasts, or by triggering osteoclastic activity¹⁵. Estrogens play a major role in bone tissue regulation mechanisms, and bisphenols act as xenoestrogens. They can therefore be responsible for hormonal imbalances with potential repercussions for the structural and functional properties of bone tissue¹⁶. Various studies have reported that cell physiology is altered by the interaction of BPA with the estrogenic and xenobiotic receptors of osteoblasts and osteoclasts¹⁷⁻²¹. However, there has been scant research on the effect of BPA on osteoblasts, and studied cell populations have been varied, including murine osteoblasts²², human fetal osteoblasts¹⁹ and, very recently, human osteoblasts obtained by primary culture²³. In this last study, BPA inhibited the proliferative capacity of osteoblasts at doses ranging from 10⁻⁵ M to 10⁻⁷ M by inducing apoptosis. It also inhibited mineralization by reducing alkaline phosphatase (ALP) synthesis and the consequent formation of calcium nodules. At molecular level, BPA inhibited the gene expression of osteogenic markers closely related to osteoblastogenesis and osteoblast function, i.e., RUNX2, OXS, OSC, ALP, COL-1, BMP-2, and BMP-7²³.

The objective of this *in vitro* study was to determine the effect of BPF, BPS, and BPAF on the growth and differentiation of human osteoblasts.

2. Material and methods

2.1. Chemical

BPF, BPS and BPAF supplied by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), supplied by Sigma-Aldrich (Co., MO), was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final DMSO concentration was always $\leq 0.05\%$.

2.2 Primary Human Osteoblasts

Primary human osteoblasts were taken from bone chips harvested during routine mandibular osteotomy or lower wisdom tooth extraction in healthy individuals at the Clinic of the School of Dentistry of the University of Granada. Three patients were recruited for this trial from which three primary human osteoblasts cell lines were established. Each cell line was cultured independently. All participants signed informed consent to participation in the study.

2.3 Treatments

The osteoblast cells obtained were treated for 24 h with BPF, BPS, or BPAF at doses of 10^{-5} M, 10^{-6} M, or 10^{-7} M; untreated cells were used as controls.

2.4 Cell Proliferation Assay

Cell proliferation was determined by MTT colorimetric assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) as described Illescas-Montes *et al*, 2017. In brief, cells were cultured in 96-well plates at a concentration of 1×10^4 cells/mL and were synchronized for 24 h in DMEM supplemented with 2 % FBS. After treatment, cells were added to medium without phenol red and with MTT and incubating them for 4 h at 37°C in humidified atmosphere (95 % air 5 % CO₂). After incubation, the formazan crystals were dissolved by adding dimethyl-sulfoxide, and the absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Sunrise™, Tecan, Männedorf, Switzerland). The

results were expressed as a percentage of the absorbance with respect to the control group.

2.5 Apoptosis and necrosis analysis

Cultured human osteoblast cells treated with different BPs at a concentration of 10^{-5} M, 10^{-6} M, or 10^{-7} M for 24 h and untreated control cells. Apoptosis and necrosis were studied as described²⁴. The results were expressed as the percentage of cells annexin-positive (apoptotic) and propidium iodide-positive (necrotic).

2.6 ALP Activity

Primary human osteoblasts were grown to confluence with culture medium supplemented with 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/mL of ascorbic acid to stimulate differentiation. After 6 days, cells were incubated with doses 10^{-7} to 10^{-5} M of BPS, BPF and BPAF for 48 h. Cells were lysed with 0.1 % Triton X-100. Untreated cells were used as controls. ALP activity was quantified with a colorimetric assay (Diagnostic kit 104-LL, Sigma, St. Louis, MO) using p-nitrophenyl phosphate as a substrate, as described Garcia-Recio *et al.*, 2022. Total protein content was estimated by the Bradford method. The results of each assay were compared with those for untreated cells grown under the same conditions and expressed as percentage of U/mg protein in relation to control group.

2.7 Mineralization Assay

Cells were cultured in DMEM with ascorbic acid (0.05 mM) and β -glycerol phosphate (5 mM), supplemented with the different doses (10^{-5} M, 10^{-6} M, or 10^{-7} M) of BPs tested or unsupplemented (control group). The plate with cells and precipitated calcium added to the cell matrix was stained with alizarin red S (2 %) at 7, 14, and 21 days. After extraction of the dye present in mineralization nodules for 15 min with 10 % (w/v) cetylpyridinium chloride in 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), the extracted stain was transferred to a 96-well plate, and the absorbance was measured at 562 nm with a spectrophotometer (ELx800, Biotek) as previously reported²³.

Control		2.63	1.069	-	7.6	1.375	-	89.767	1.858	-
S	10 ⁻⁵	1	0.1	0.117	26.6	4.453	0.000*	72.4	4.424	0.000*
	10 ⁻⁶	1	0.173	0.115	12.567	0.666	0.048*	86.433	0.265	0.141
	10 ⁻⁷	1.73	0.503	0.283	12.867	2.248	0.039*	85.403	2.663	0.092
F	10 ⁻⁵	1.3	0.265	0.064	12.6	0.603	0.034*	86.1	0.850	0.064
	10 ⁻⁶	1.1	0.520	0.039	7.933	2.926	0.869	90.967	2.689	0.161
	10 ⁻⁷	1.833	0.907	0.233	8.7	3.477	0.589	89.467	4.331	0.929
AF	10 ⁻⁵	0.933	0.351	0.099	6.633	1.106	0.411	92.411	0.709	0.052
	10 ⁻⁶	0.967	0.115	0.113	7.833	1.790	0.839	91.2	1.955	0.270
	10 ⁻⁷	0.867	0.306	0.094	8.533	1.070	0.427	90.6	0.781	0.501

Table 1. Results of apoptosis/necrosis assay in primary human osteoblast lines treated for 24h with BPS, BPF, or BPAF at doses of 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, or 10⁻⁷ M. Data are reported as means±standard deviation. SD: (standard deviation). *: $p < 0.05$

3.2 Effect of BPF, BPS, and BPAF on the synthesis of alkaline phosphatase.

Figure 2 depicts the ALP activity of human osteoblasts at 24 h of treatment with doses of 10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷ M of BPF, BPS, or BPAF. As observed, treatment with BPF inhibited enzymatic activity at the three studied doses. However, treatment with BPS and BPAF only produced significant changes at the higher doses (10⁻⁵ and 10⁻⁶ M).

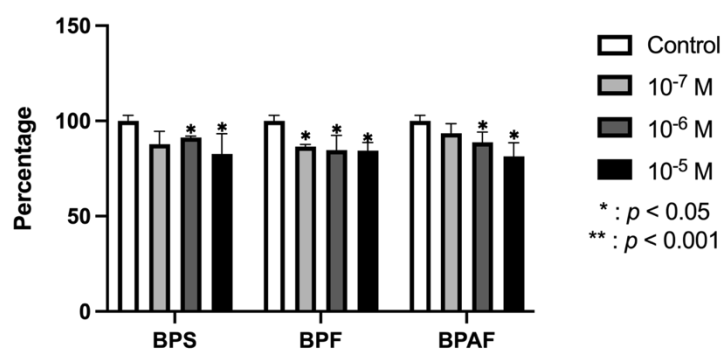


Fig. 2. ALP activity of primary cell line after 24 h of treatment with BPS, BPF, or BPAF at doses of 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, or 10⁻⁷ M. Activity was measured in cell lysates and normalized to total cellular protein (U/mg protein). Data are reported as means±standard deviation.

3.3 Effect of BPF, BPS, and BPAF on mineralization in vitro.

Mineralization was measured at 7, 14, and 21 days of culture in osteogenic medium culture supplemented with BPF, BPS, or BPAF at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M. The results depicted in Figure 3 show no significant change in mineralization *versus* controls at 7 or 14 days of treatment but a significant inhibition at 21 days, due to a reduced formation of calcium nodules with all three doses of BPF or BPS and the higher doses of BPAF (10^{-5} and 10^{-6} M).

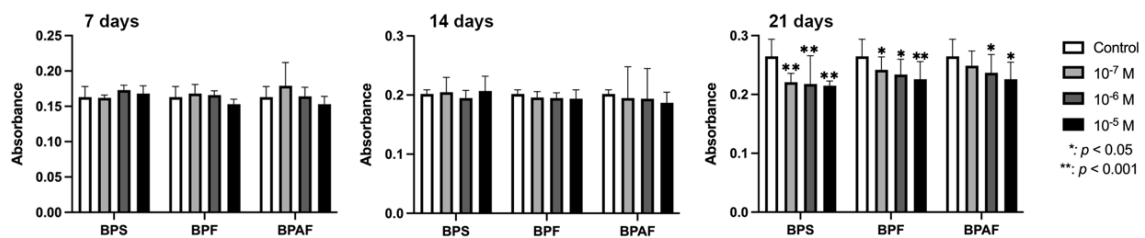


Fig. 3. Quantitative study of mineralization (nodule formation) after culture of primary osteoblast line in osteogenic medium supplemented with BPS, BPF, or BPAF (10^{-5} M, 10^{-6} M, or 10^{-7} M). Absorbance data are reported as means \pm standard deviation.

4. Discussion

BPA analogs have widely replaced BPA as apparently non-toxic alternatives in the fabrication of utensils and containers, especially in the food industry. However, their innocuous status is currently under debate. In this study of cultured human osteoblasts, BPA analogs BPS, BPF, and BPAF were found to adversely affect their physiology, altering their growth, ALP synthesis, and mineralization in a dose-dependent manner.

According to the present findings, the proliferation of cultured human osteoblasts is significantly inhibited by 24 hours of treatment with BPS at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , or 10^{-7} M and with BPF at the highest dose (10^{-5} M), and this inhibition is related to their induction of apoptosis. Treatment with BPAF at the same doses had no effect on the growth of this cell population. Our research group previously reported that BPA itself (at doses of 10^{-5} ,

10^{-6} , or 10^{-7} M) inhibits the proliferation of cultured human osteoblasts by inducing apoptosis²³, in agreement with observations of its adverse effect on the growth of mouse²² and human fetal¹⁹ osteoblasts (MC3T3-E1 and hFOB1.19 lines, respectively).

Treatment with each analog was found to dose-dependently inhibit ALP synthesis and mineralization, altering the differentiation and function of this cell population. The same inhibitory effects were reported in mouse osteoblasts treated with BPA at doses of 2.5 and 12.5 μ M but not 0.5 μ M [22] and in BPA-treated human osteoblasts at even the lowest doses tested (10^{-6} and 10^{-7} M)²³.

It has been demonstrated that both BPS and BPF can bind to estrogen receptors and exert similar estrogenic and antiandrogenic activities to those of BPA, with BPF having less potent effects in comparison to BPA or BPS. Accordingly, both BP analogs have evidenced steroidogenic activity, teratogenicity, genotoxicity, carcinogenicity, and metabolic effects^{26,27} also observed the negative repercussions of BPS and BPF on the biological function of humans and rodents, and Rochester and Bolden (2015) described the toxicity of BPS as equivalent to that of BPA. Since then, *in vitro* and *in vivo* studies have verified the adverse effects of BPS exposure on reproductive, endocrinal, and nervous systems in animals and humans, which may even include the triggering of oxidative stress^{12,26,28–31}. BPF exposure has adverse health effects *via* similar mechanisms to those observed for BPA and BPS, altering signaling pathways involved in lipid metabolism and adipogenesis^{28,32,33} and causing DNA damage^{33,34}. However, it was recently found that neither BPA nor BPA impairs the viability or differentiation of cultured murine osteoclasts (RAW 264.7 line) at doses of 0.1, 1, or 10 μ M³⁵.

Likewise, *in vitro* and *in vivo* research findings have shown that BPS and BPF have a similar metabolism and biological fate to that of BPA^{12,27}. Food is currently considered the predominant source of human exposure to BPS, with a relatively small contribution from personal care products. BPS and BPF are detected in urine (but rarely in other human matrices) at a lower concentration than that of BPA, which may be attributable to the longer time period of exposure to BPA^{30,33}. Although the percutaneous absorption of BPS is lesser, its lower biotransformation efficiency results in a plasma clearance rate *two-fold lower than* that of BPA. This negative effect should be considered when evaluating the consequences of replacing BPA with BPS^{36,37}. The above evidence suggests that the

presence of these analogs in the blood may have the same consequences for bone tissue as observed for other tissues and systems.

The health effects of exposure to BPAF are less well known. It has been found to increase oxidative stress in erythrocytes to an even greater degree than observed after BPA or BPS treatment ^{38,39}. In the same way, BPAF proved to be a more potent endocrine disruptor than BPA in *in vivo* studies of different species, such as zebra-fish and rat ^{40,41} and was found to compromise the reproductive health of mice, in both *in vitro* and *in vivo* studies ^{42,43}.

Molecular studies have attributed differences in toxic effects among different bisphenols (BPA, BPAF, and BPS) to variations in their affinities and binding sites. Multiple sites with variable binding affinities have been described in the androgen receptor for these bisphenols, indicating the availability of modified binding surfaces on this receptor for co-regulating interactions ⁴⁴.

In the present study of human osteoblasts, BPF and BPS affected both their growth and differentiation, while BPAF altered their differentiation alone, through the dose-dependent inhibition of ALP synthesis and mineralization. These data suggest that BPA analogs can impair bone health, although further research is needed to verify these effects. Our results are in line with the need to reduce the intake of BPs, as stated by EFSA in its latest report ¹¹. And on the other hand, the use of these BPs in industry, given that an increase in the presence of BPs, including those studied in this work, has been observed in the environment ^{45,46}.

According to these results, BPF and BPS adversely affect the viability, differentiation, and function of cultured human osteoblasts in a dose-dependent manner, whereas exposure to BPAF only alters their ALP synthesis and mineralization.

5. References

1. Adoamnei, E.; Mendiola, J.; Vela-Soria, F.; Fernández, M.F.; Olea, N.; Jørgensen, N.; Swan, S.H.; Torres-Cantero, A.M. Urinary Bisphenol A Concentrations Are Associated with Reproductive Parameters in Young Men. *Environ. Res.* 2018, 161, 122–128, doi:10.1016/j.envres.2017.11.002.

2. den Braver-Sewradj, S.P.; van Spronsen, R.; Hessel, E.V.S. Substitution of Bisphenol A: A Review of the Carcinogenicity, Reproductive Toxicity, and Endocrine Disruption Potential of Alternative Substances. *Crit. Rev. Toxicol.* 2020, 50, 128–147, doi:10.1080/10408444.2019.1701986.
3. Ma, Y.; Liu, H.; Wu, J.; Yuan, L.; Wang, Y.; Du, X.; Wang, R.; Marwa, P.W.; Petlulu, P.; Chen, X.; *et al.* The Adverse Health Effects of Bisphenol A and Related Toxicity Mechanisms. *Environ. Res.* 2019, 176, 108575, doi:10.1016/j.envres.2019.108575.
4. Pelch, K.; Wignall, J.A.; Goldstone, A.E.; Ross, P.K.; Blain, R.B.; Shapiro, A.J.; Holmgren, S.D.; Hsieh, J.-H.; Svoboda, D.; Auerbach, S.S.; *et al.* A Scoping Review of the Health and Toxicological Activity of Bisphenol A (BPA) Structural Analogues and Functional Alternatives. *Toxicology* 2019, 424, 152235, doi:10.1016/j.tox.2019.06.006.
5. Abraham, A.; Chakraborty, P. A Review on Sources and Health Impacts of Bisphenol A. *Rev. Environ. Health* 2020, 35, 201–210, doi:10.1515/reveh-2019-0034.
6. Huang, Y.Q.; Wong, C.K.C.; Zheng, J.S.; Bouwman, H.; Barra, R.; Wahlström, B.; Neretin, L.; Wong, M.H. Bisphenol A (BPA) in China: A Review of Sources, Environmental Levels, and Potential Human Health Impacts. *Environ. Int.* 2012, 42, 91–99, doi:10.1016/j.envint.2011.04.010.
7. Staples, C.A.; Dome, P.B.; Klecka, G.M.; Oblock, S.T.; Harris, L.R. A Review of the Environmental Fate, Effects, and Exposures of Bisphenol A. *Chemosphere* 1998, 36, 2149–2173, doi:10.1016/S0045-6535(97)10133-3.
8. Fromme, H.; Küchler, T.; Otto, T.; Pilz, K.; Müller, J.; Wenzel, A. Occurrence of Phthalates and Bisphenol A and F in the Environment. *Water Res.* 2002, 36, 1429–1438, doi:10.1016/s0043-1354(01)00367-0.
9. European Commission Commission Implementing Regulation (EU) No 321/2011 of 1 April 2011 Amending Regulation (EU) No 10/2011 as Regards the Restriction of Use of Bisphenol A in Plastic Infant Feeding Bottles Text with EEA Relevance; 2011; Vol. 087;
10. European Commission Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 Amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council Concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as Regards Bisphenol A (Text with EEA Relevance); 2016; Vol. 337;.

11. EFSA, (European Food Safety Authority) Bisphenol A: EFSA Draft Opinion Proposes Lowering the Tolerable Daily Intake | EFSA Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/bisphenol-efsa-draft-opinion-proposes-lowering-tolerable-daily-intake> (accessed on 26 July 2022).
12. Rochester, J.R.; Bolden, A.L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* 2015, 123, 643–650, doi:10.1289/ehp.1408989.
13. Rosenfeld, C.S. Neuroendocrine Disruption in Animal Models Due to Exposure to Bisphenol A Analogues. *Front. Neuroendocrinol.* 2017, 47, 123–133, doi:10.1016/j.yfrne.2017.08.001.
14. Chen, D.; Kannan, K.; Tan, H.; Zheng, Z.; Feng, Y.-L.; Wu, Y.; Widelka, M. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 5438–5453, doi:10.1021/acs.est.5b05387.
15. Yaglova, N.V.; Yaglov, V.V. Endocrine Disruptors as a New Etiologic Factor of Bone Tissue Diseases (Review). *Mod. Technol. Med.* 2021, 13, 84–94, doi:10.17691/stm2021.13.2.10.
16. Chin, K.-Y.; Pang, K.-L.; Mark-Lee, W.F. A Review on the Effects of Bisphenol A and Its Derivatives on Skeletal Health. *Int. J. Med. Sci.* 2018, 15, 1043–1050, doi:10.7150/ijms.25634.
17. Bolli, A.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P.; Del Pozzo, G.; Manco, I.; Vietri, M.T.; Mita, L.; Altucci, L.; Mita, D.G.; Marino, M. Laccase Treatment Impairs Bisphenol A-Induced Cancer Cell Proliferation Affecting Estrogen Receptor Alpha-Dependent Rapid Signals. *IUBMB Life* 2008, 60, 843–852, doi:10.1002/iub.130.
18. Giannattasio, R.; Lisco, G.; Giagulli, V.A.; Settembrini, S.; De Pergola, G.; Guastamacchia, E.; Lombardi, G.; Triggiani, V. Bone Disruption and Environmental Pollutants. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 2021, doi:10.2174/1871530321666210118163538.
19. Thent, Z.C.; Froemming, G.R.A.; Muid, S. Bisphenol A Exposure Disturbs the Bone Metabolism: An Evolving Interest towards an Old Culprit. *Life Sci.* 2018, 198, 1–7, doi:10.1016/j.lfs.2018.02.013.

20. Vrzal, R.; Zenata, O.; Dorcakova, A.; Dvorak, Z. Environmental Pollutants Parathion, Paraquat and Bisphenol A Show Distinct Effects towards Nuclear Receptors-Mediated Induction of Xenobiotics-Metabolizing Cytochromes P450 in Human Hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 2015, 238, 43–53, doi:10.1016/j.toxlet.2015.07.008.
21. Wang, T.; Xu, F.; Song, L.; Li, J.; Wang, Q. Bisphenol A Exposure Prenatally Delays Bone Development and Bone Mass Accumulation in Female Rat Offspring via the ER β /HDAC5/TGF β Signaling Pathway. *Toxicology* 2021, 458, 152830, doi:10.1016/j.tox.2021.152830.
22. Hwang, J.K.; Min, K.H.; Choi, K.H.; Hwang, Y.C.; Jeong, I.-K.; Ahn, K.J.; Chung, H.-Y.; Chang, J.S. Bisphenol A Reduces Differentiation and Stimulates Apoptosis of Osteoclasts and Osteoblasts. *Life Sci.* 2013, 93, 367–372, doi:10.1016/j.lfs.2013.07.020.
23. García-Recio, E.; Costela-Ruiz, V.J.; Melguizo-Rodríguez, L.; Ramos-Torrecillas, J.; García-Martínez, O.; Ruiz, C.; de Luna-Bertos, E. Repercussions of Bisphenol A on the Physiology of Human Osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5349, doi:10.3390/ijms23105349.
24. Costela-Ruiz, V.J.; Melguizo-Rodríguez, L.; Illescas-Montes, R.; Ramos-Torrecillas, J.; Manzano-Moreno, F.J.; Ruiz, C.; Bertos, E.D.L.- Effects of Therapeutic Doses of Celecoxib on Several Physiological Parameters of Cultured Human Osteoblasts. *Int. J. Med. Sci.* 2019, 16, 1466–1472, doi:10.7150/ijms.37857.
25. Melguizo-Rodríguez, L.; Javier Manzano-Moreno, F.; De Luna-Bertos, E.; Rivas, A.; Ramos-Torrecillas, J.; Ruiz, C.; Garcia-Martinez, O. Effect of Olive Oil Phenolic Compounds on Osteoblast Differentiation. *Eur. J. Clin. Invest.* 2018, 48, UNSP e12904, doi:10.1111/eci.12904.
26. Eladak, S.; Grisin, T.; Moison, D.; Guerquin, M.-J.; N'Tumba-Byn, T.; Pozzi-Gaudin, S.; Benachi, A.; Livera, G.; Rouiller-Fabre, V.; Habert, R. A New Chapter in the Bisphenol A Story: Bisphenol S and Bisphenol F Are Not Safe Alternatives to This Compound. *Fertil. Steril.* 2015, 103, 11–21, doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.005.
27. Rosenmai, A.K.; Dybdahl, M.; Pedersen, M.; Alice van Vugt-Lussenburg, B.M.; Wedebye, E.B.; Taxvig, C.; Vinggaard, A.M. Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? *Toxicol. Sci.* 2014, 139, 35–47, doi:10.1093/toxsci/kfu030.

28. Boucher, J.G.; Ahmed, S.; Atlas, E. Bisphenol S Induces Adipogenesis in Primary Human Preadipocytes From Female Donors. *Endocrinology* 2016, 157, 1397–1407, doi:10.1210/en.2015-1872.
29. Qiu, W.; Zhao, Y.; Yang, M.; Farajzadeh, M.; Pan, C.; Wayne, N.L. Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish. *Endocrinology* 2016, 157, 636–647, doi:10.1210/en.2015-1785.
30. Wu, L.-H.; Zhang, X.-M.; Wang, F.; Gao, C.-J.; Chen, D.; Palumbo, J.R.; Guo, Y.; Zeng, E.Y. Occurrence of Bisphenol S in the Environment and Implications for Human Exposure: A Short Review. *Sci. Total Environ.* 2018, 615, 87–98, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.194.
31. Zhao, C.; Tang, Z.; Yan, J.; Fang, J.; Wang, H.; Cai, Z. Bisphenol S Exposure Modulate Macrophage Phenotype as Defined by Cytokines Profiling, Global Metabolomics and Lipidomics Analysis. *Sci. Total Environ.* 2017, 592, 357–365, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.035.
32. Boucher, J.G.; Gagné, R.; Rowan-Carroll, A.; Boudreau, A.; Yauk, C.L.; Atlas, E. Bisphenol A and Bisphenol S Induce Distinct Transcriptional Profiles in Differentiating Human Primary Preadipocytes. *PLOS ONE* 2016, 11, e0163318, doi:10.1371/journal.pone.0163318.
33. Lehmler, H.-J.; Liu, B.; Gadogbe, M.; Bao, W. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. *ACS Omega* 2018, 3, 6523–6532, doi:10.1021/acsomega.8b00824.
34. Cabaton, N.; Dumont, C.; Severin, I.; Perdu, E.; Zalko, D.; Cherkaoui-Malki, M.; Chagnon, M.-C. Genotoxic and Endocrine Activities of Bis(Hydroxyphenyl)Methane (Bisphenol F) and Its Derivatives in the HepG2 Cell Line. *Toxicology* 2009, 255, 15–24, doi:10.1016/j.tox.2008.09.024.
35. Kim, H.-M.; Lee, S.-M.; Choi, J.; Soung, N.-K.; Heo, J.-D. Effects of Bisphenol A and Its Alternatives, Bisphenol F and Tetramethyl Bisphenol F on Osteoclast Differentiation. *Molecules* 2021, 26, 6100, doi:10.3390/molecules26206100.
36. Gayrard, V.; Lacroix, M.Z.; Gély, C.A.; Grandin, F.C.; Léandri, R.; Bouchard, M.; Roques, B.; Toutain, P.-L.; Picard-Hagen, N. Toxicokinetics of Bisphenol S in Rats for Predicting

- Human Bisphenol S Clearance from Allometric Scaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2020, 386, 114845, doi:10.1016/j.taap.2019.114845.
37. Liu, J.; Martin, J.W. Comparison of Bisphenol A and Bisphenol S Percutaneous Absorption and Biotransformation. *Environ. Health Perspect.* 2019, 127, 067008, doi:10.1289/EHP5044.
38. Huang, M.; Liu, S.; Fu, L.; Jiang, X.; Yang, M. Bisphenol A and Its Analogues Bisphenol S, Bisphenol F and Bisphenol AF Induce Oxidative Stress and Biomacromolecular Damage in Human Granulosa KGN Cells. *Chemosphere* 2020, 253, 126707, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126707.
39. Maćczak, A.; Cyrkler, M.; Bukowska, B.; Michałowicz, J. Bisphenol A, Bisphenol S, Bisphenol F and Bisphenol AF Induce Different Oxidative Stress and Damage in Human Red Blood Cells (in Vitro Study). *Toxicol. In Vitro* 2017, 41, 143–149, doi:10.1016/j.tiv.2017.02.018.
40. Li, J.; Sheng, N.; Cui, R.; Feng, Y.; Shao, B.; Guo, X.; Zhang, H.; Dai, J. Gestational and Lactational Exposure to Bisphenol AF in Maternal Rats Increases Testosterone Levels in 23-Day-Old Male Offspring. *Chemosphere* 2016, 163, 552–561, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.059.
41. Yang, X.; Liu, Y.; Li, J.; Chen, M.; Peng, D.; Liang, Y.; Song, M.; Zhang, J.; Jiang, G. Exposure to Bisphenol AF Disrupts Sex Hormone Levels and Vitellogenin Expression in Zebrafish. *Environ. Toxicol.* 2016, 31, 285–294, doi:10.1002/tox.22043.
42. Liang, S.; Yin, L.; Shengyang Yu, K.; Hofmann, M.-C.; Yu, X. High-Content Analysis Provides Mechanistic Insights into the Testicular Toxicity of Bisphenol A and Selected Analogues in Mouse Spermatogonial Cells. *Toxicol. Sci.* 2017, 155, 43–60, doi:10.1093/toxsci/kfw178.
43. Siracusa, J.S.; Yin, L.; Measel, E.; Liang, S.; Yu, X. Effects of Bisphenol A and Its Analogs on Reproductive Health: A Mini Review. *Reprod. Toxicol.* 2018, 79, 96–123, doi:10.1016/j.reprotox.2018.06.005.
44. Perera, L.; Li, Y.; Coons, L.A.; Houtman, R.; van Beuningen, R.; Goodwin, B.; Auerbach, S.S.; Teng, C.T. Binding of Bisphenol A, Bisphenol AF, and Bisphenol S on the Androgen Receptor: Coregulator Recruitment and Stimulation of Potential Interaction Sites. *Toxicol. In Vitro* 2017, 44, 287–302, doi:10.1016/j.tiv.2017.07.020.

45. Catenza, C.J.; Farooq, A.; Shubear, N.S.; Donkor, K.K. A Targeted Review on Fate, Occurrence, Risk and Health Implications of Bisphenol Analogues. *Chemosphere* 2021, 268, 129273, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129273.
46. Liu, J.; Zhang, L.; Lu, G.; Jiang, R.; Yan, Z.; Li, Y. Occurrence, Toxicity and Ecological Risk of Bisphenol A Analogues in Aquatic Environment – A Review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021, 208, 111481, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111481.

OBJETIVO 3

Analizar *in vitro* el efecto de los análogos del BPA (BPS, BPF y BPAF) sobre la expresión génica de ALP, Col-1, OSC, Runx2, OSX, BMP-2 y BMP-7 en osteoblastos humanos primarios.

Abstract

Bone effects attributed to bisphenols (BPs) include the inhibition of growth and differentiation. This study analyzes the effect of BPA analogs (BPS, BPF, and BPAF) on the gene expression of osteogenic markers RUNX2, Osterix (OSX), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), BMP-7, alkaline phosphatase (ALP), collagen-1 (COL-1), and osteocalcin (OSC). Human osteoblasts were obtained by primary culture from bone chips harvested during routine dental work in healthy volunteers and were treated with BPF, BPS, or BPAF for 24 h at doses of 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} M. Non-treated cells were used as controls. Real-time PCR was used to determine the gene expression of osteogenic markers RUNX2, OSX, BMP-2, BMP-7, ALP, COL-1, and OSC. The expression of all studied markers was inhibited in the presence of each analog; some markers (COL-1; OSC, BMP2) were inhibited at all three doses and others only at the highest doses (10^{-5} and 10^{-6} M). Results obtained for the gene expression of osteogenic markers reveal an adverse effect of BPA analogs (BPF, BPS, and BPAF) on the physiology of human osteoblasts. The impact on ALP, COL-1, and OSC synthesis and therefore on bone matrix formation and mineralization is similar to that observed after exposure to BPA. Further research is warranted to determine the possible contribution of BP exposure to the development of bone diseases such as osteoporosis.

Keywords: Bisphenol S; bisphenol F; bisphenol AF; osteoblast; gene expresión

1. Introduction

The term Endocrine Disruptor (EDC) indicates a set of chemicals with a specific effect on the endocrine system that interferes with receptor-mediated hormone activity. EDCs are substances capable of altering cellular metabolism and causing long-term toxic effect. This group includes molecules of natural origin or synthetic compounds ^{1,2}. Bisphenols are compounds that are widely found in nature as they are used in the manufacture of plastics and resins. Since they are EDCs, they can imitate or block hormone receptors, altering the concentration and metabolism of hormones and exerting adverse effects at different levels of the organism ³. Due to widespread exposure and concern that BPA was a toxicant affecting, among other areas, reproductive health, health authorities urged manufacturers to abandon the use of BPA and introduce similar safer chemicals. BPA analogues (BPF, BPS, and BPAF) were designed to replace BPA in the manufacture of certain materials and utensils, especially those in contact with food or used in the home, avoiding the known toxicity of this compound. However, various studies have found that the toxicity of these analogs is similar to that previously observed for BPA ⁴⁻⁸.

BPA has a harmful effect on bone tissue since it can interact via estrogenic receptors with the two main bone tissue populations, osteoblasts and osteoclasts, possibly compromising bone health ¹. BPA inhibits the growth of murine (MC3T3-E1 cell line) ⁹ and human fetal (hFOB 1.19 cell line) osteoblasts ¹⁰ and human osteoblasts obtained by primary culture from bone implants ¹¹. This growth inhibition results from apoptosis induction, which compromises cell viability in a dose-dependent manner. BPA can also affect the function of this cell population by inhibiting alkaline phosphatase (ALP) synthesis and therefore the mineralization process ¹⁰⁻¹². BPA treatment has been found to alter the gene expression of RUNX2, Osterix (OSX), β catenin, Collagen-1 (COL-1), osteocalcin (OSC), and bone morphogenetic proteins (BMPs) 2 and 7 (BMP-2 and BMP-7) ^{9-11,13}, and the expression of these osteogenic markers is associated with the differentiation and maturation and therefore functional capacity of osteoblasts ¹⁴.

Given that the presence of BPA has been found to modulate the growth and function of human osteoblasts, the objective of this study was to determine the effect of osteoblast culture with BPF, BPS, or BPAF on the gene expression of RUNX2, ALP, OSX, COL-1, OSC, BMP-2, and BMP-7.

2. Results

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) results for the gene expression of osteoblasts after 24 h of culture with BPS, BPF and BPAF at doses 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} M were compared with results for untreated control cells.

2.1. RUNX2

RUNX2 gene expression was significantly and dose-dependently reduced by treatment with each BP (BPF, BPS, or BPAF) at each dose except for BPAF, which produced no significant change in expression at the lowest dose (10^{-7} M) (Figure 1).

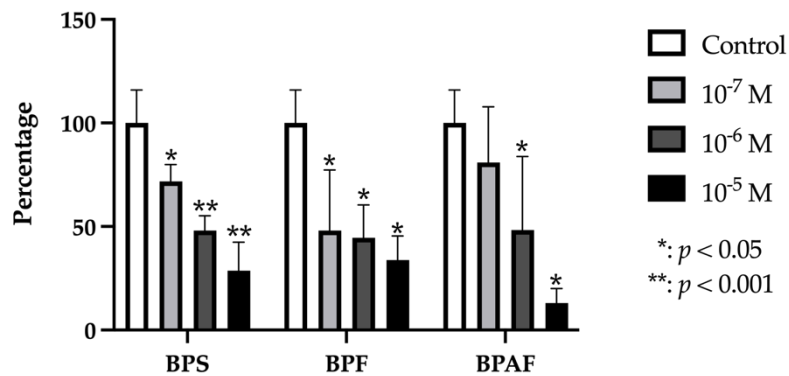


Fig. 1. Expression of RUNX2 in primary human osteoblasts treated for 24 h with bisphenol S, F and AF (10^{-7} , 10^{-6} , or 10^{-5} M). The assay was performed in triplicate with each of the three primary human osteoblast cell lines. Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant difference * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

2.2. BMP-2 and BMP-7

Gene expression of both BMP2 and BMP7 was significantly and dose-dependently decreased by treatment with each BP at each dose except for the lowest dose of BPS (10^{-7} M), which produced no significant change in expression (Figure 2).

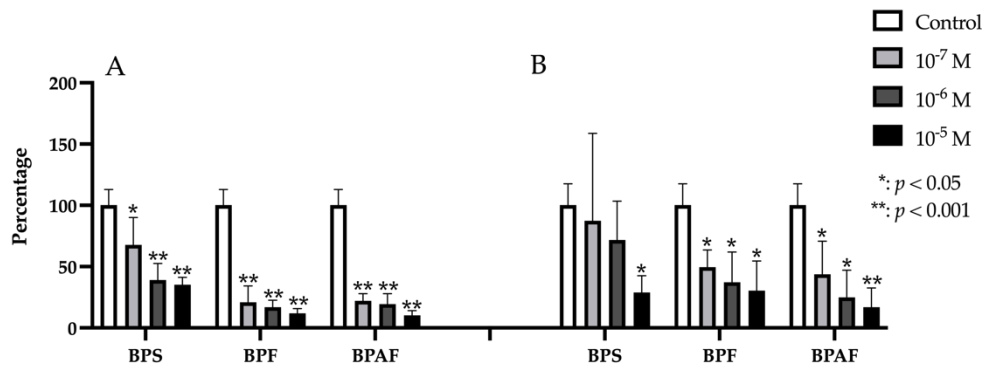


Fig. 2. Expression of BMP2 (A) and BMP7 (B) in primary human osteoblasts treated for 24 h with bisphenol S, F and AF (10^{-7} , 10^{-6} , or 10^{-5} M). The assay was performed in triplicate with each of the three primary human osteoblast cell lines. Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

2.3. OSX

OSX gene expression was significantly and dose-dependently reduced by treatment with each dose of each BP except for BPAF, which had no significant effect at any dose (Figure 3).

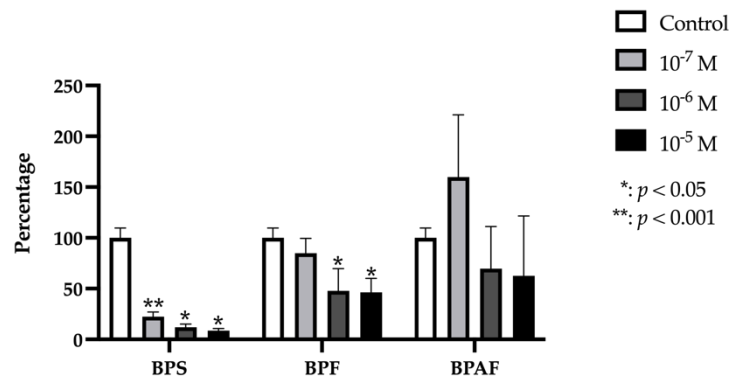


Fig. 3. Expression of OSX in primary human osteoblasts treated for 24 h with bisphenol S, F and AF (10^{-7} , 10^{-6} , or 10^{-5} M). The assay was performed in triplicate with each of the three primary human osteoblast cell lines. Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

2.4. ALP

ALP gene expression was significantly and dose-dependently reduced by treatment with each dose of BPF and BPS but was only significantly decreased by treatment with the highest dose of BPAF (Figure 4).

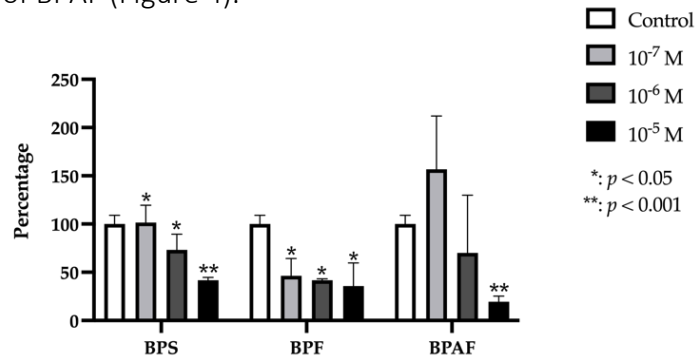


Fig. 4. Expression of ALP in primary human osteoblasts treated for 24 h with bisphenol S, F and AF (10^{-7} , 10^{-6} , or 10^{-5} M). The assay was performed in triplicate with each of the three primary human osteoblast cell lines. Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

2.5. OSC

OSC gene expression was significantly and dose-dependently decreased by each BP at each dose (Figure 5).

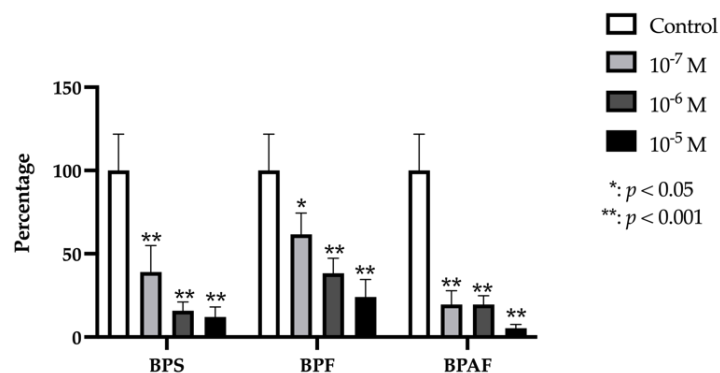


Fig. 5. Expression of OSC in primary human osteoblasts treated for 24 h with bisphenol S, F and AF (10^{-7} , 10^{-6} , or 10^{-5} M). The assay was performed in triplicate with each of the three primary human osteoblast cell lines. Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

2.6. COL-1

Col-1 gene expression was significantly and dose-dependently reduced by treatment with each dose of BPF and BPS, but BPAF produced a significant change in expression at the higher doses alone (10^{-5} , and 10^{-6} M) (Figure 6).

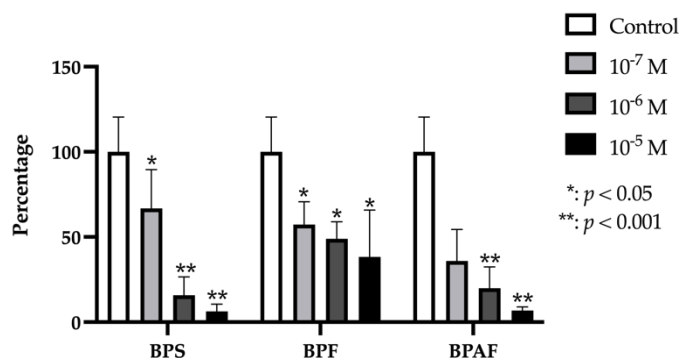


Fig. 6. Expression of Col-1 in primary human osteoblasts treated for 24 h with bisphenol S, F and AF (10^{-7} , 10^{-6} , or 10^{-5} M). The assay was performed in triplicate with each of the three primary human osteoblast cell lines. Data are expressed as percentage expression with respect to control \pm standard deviation. Significant differences * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

3. Discussion

In this study, human osteoblasts cultured for 24 h in the presence of BPA analogs (BPF, BPS, or BPAF) underwent significant changes in the gene expression of RUNX2, OXS, OSC, ALP, COL-1, BMP-2, and BMP-7, osteogenic markers with key roles in osteoblast maturation and function¹⁵⁻¹⁷. Culture with these BPA analogs was found to inhibit the expression of these markers in a dose-dependent manner.

Mesenchymal cell-based osteogenic differentiation is regulated by various transcriptional factors (e.g., RUNX-2/Cbfa, BMP, and OSX) that are essential for regulating the genes involved in the production of bone extracellular matrix proteins (e.g., ALP, COL-1, bone sialoprotein [BSP], OSC, and osteopontin [OPN]) and for inducing bone mineraliza-

tion^{18–20}. RUNX-2/Cbfa, BMP, and OSX genes participate in the formation and differentiation of osteoblasts by activating signals that favor the production of molecules closely related to bone metabolism^{17,21}. Each stage of osteoblast functional differentiation (proliferation, bone matrix synthesis, and mineralization) is associated with certain cell markers¹⁹. Specifically, OSX and RUNX2 are expressed in immature osteoblasts and maintain their expression throughout the osteogenic lineage^{20,22}, while BMP-2 and BMP-7 are both related to osteoblast formation and differentiation^{23–26}, and the major inhibition of their expression can halt the differentiation process²⁷. In the present study, the presence of BPF, BPS, or BPAF was found to inhibit the gene expression of BMP-2, BMP-7, RUNX2, and OSX.

Comparison with published findings on the expression of osteogenic markers by human osteoblasts cultured in the presence of BPA¹¹ shows that culture with BPS has similar effects but that culture with BPF inhibits a larger number of osteogenic markers at all three doses (10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} M). In the case of BPAF, higher doses are required to alter the expression of these osteogenic markers, while the expression of OSX is not changed at any of the three doses assayed. Given the functional involvement of these markers in the osteoblast lineage, not only BPA but also its analogs BPF, BPS, and BPAF may compromise osteoblast differentiation and maturation. This could have undesirable repercussions on the complex process of bone development, as these markers play a crucial role in the molecular mechanism of osteogenesis.

The observation of a decrease in the expression of RUNX2, OXS, and BPMs in human osteoblasts cultured in the presence of BPF, BPS, or BPAF helps to explain the reduced expression of the osteogenic markers ALP, OSC, and COL-1, which play a major role in the formation and mineralization of the bone tissue extracellular matrix. ALP is a metalloenzyme that hydrolyzes monophosphate esters at alkaline pH (8 - 10), thereby releasing the inorganic phosphorus required for bone mineralization²⁸. ALP is expressed at an early stage of osteoblast differentiation, being present on the cell surface and in bone matrix vesicles. Its expression is subsequently reduced during osteoblast maturation, when other genes (e.g., OSC) are upregulated²⁹. OSC is a gene of late expression that encodes the homonymous peptide hormone synthesized by osteoblasts, which is the main non-

collagen bone tissue protein. It contributes to bone conformation and mineralization by favoring the ordered deposit of minerals through regulation of the amount and size of hydroxyapatite crystals. Hence, the main function of OSC is the regulation of matrix synthesis^{30,31}. Finally, COL-1, which is the most abundant protein of the bone matrix, is synthesized by mature osteoblasts and plays a structural role. Its expression is observed in nodules mineralized in vitro and mainly in the mature matrix of bone in vivo. COL-1 is considered an osteoblast-specific marker, despite being expressed by cells that are not of osteogenic lineage³².

Bone remodeling is an active process crucial to adult bone homeostasis that involves a balanced coordination of bone formation and resorption to maintain bone mass and systemic mineral homeostasis. Therefore, the balance of this process guarantees bone health, and any factor that alters it, whether endogenous or exogenous, compromises bone health. Under normal conditions, 5-10 % of the total bone is renewed every year. In bone remodeling, the osteoclasts resorb a certain amount of bone and the osteoblasts form the osteoid matrix and mineralize it to fill the cavity previously created. It is therefore a complex process in which cellular and molecular components are closely related. The cells closely involved (osteoclasts, preosteoblasts and osteoblasts) are governed by a series of molecular signals that will allow the normal functioning of the bone and the maintenance of bone mass. When this process loses its balance, bone pathology appears, either by excess (osteopetrosis) or by defect (osteoporosis)^{33,34}.

The effect on the gene expressions of ALP, COL-1, and OSC of culture with the three BPs under study suggest that these compounds have a negative impact on the bone extracellular matrix, similar to the reported effects of BPA at osteoblast level. This effect on the expression of these markers is closely related to the inhibition of mineralization and ALP activity observed in human osteoblasts cultured in osteogenic medium in the presence of BPA¹¹. Human exposure to bisphenols is widespread in the general population and specifically in workers handling these substances³⁵. The ubiquity of BPs, indicates that this exposure occurs through food intake, drinking water, by contact of skin with thermal paper or dust inhalation³⁶⁻³⁹. It has been observed that 75 % of 267 foods tested, had bisphenols in concentrations ranging from 0.10 ng/g fresh weight to 1130 ng/g fresh

weight³⁸. Moreover, the presence of these bisphenols has been determined in human urine, serum and breast milk samples^{40–43}. The reported presence of Bisphenol analogues of BPA in human biological samples coupled with the close structural similarity to BPA suggests a possible adverse effect on the organism as described for BPA which has already been documented in other tissues. In this regard, our findings suggest that lifetime exposure to BPs could represent a possible risk factor for the development of osteoporosis, a disease of increasing prevalence⁴⁴. Given the importance of the potential risks of exposure to these BPs, it is necessary to study in depth the impact of these molecules on bone tissue, both *in vitro* and *in vivo*.

4. Material and Methods

4.1. Chemicals

BPF, BPS, and BPAF were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a final DMSO concentration of ≤ 0.05 %.

4.2. Isolated and primary culture of Human Osteoblasts

Primary human osteoblasts were obtained from trabecular bone chips harvested during routine mandibular osteotomy or third molar extraction in healthy individuals at the Clinic of the School of Odontology of our university. Three patients were recruited for this trial from which three primary human osteoblasts cell lines were established. All individuals signed their informed consent to participation in the study, which was approved by the university research ethics committee (Reg. No. 523/CEIH/2018). Osteoblasts were isolated, characterized, and cultured as described by García-Martínez *et al.*, (2011) and Melguizo-Rodríguez *et al.* (2018)^{45,46}. Bone fragments were washed thoroughly in phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4) and were seeded onto culture dishes (Falcon Labware, Oxford, UK). Then they were covered with complete culture medium [Dulbecco's-modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, CA) supplemented with 100 IU/ml penicillin (Lab ERN SA, Barcelona, Spain), 50 μ g/ml gentamicin (Laboratorios Normon SA, Madrid, Spain), 2.5 μ g/ml amphotericin B (Sigma,

St Louis, MO), 1 % glutamine (Sigma, St Louis, MO, USA), and 2 % HEPES (Sigma, St Louis, MO, USA) and 20 % fetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK)].

Cells were kept in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂ and at 37 °C. After reaching confluence (2-3 weeks), cells were detached from the culture flask with a solution of 0.05 % trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 0.02 % ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA; Sigma, St Louis, MO, USA) and were washed and suspended in complete culture medium with 20 % FBS.

4.3. Treatments

Osteoblasts obtained were treated for 24 h with BPS, BPF, or BPAF (Sigma-Aldrich) at doses of 10⁻⁵, 10⁻⁶, or 10⁻⁷ M; untreated cells were used as controls.

4.4. Effect of BPF, BPS, and BPAF on the gene expression of human osteoblasts

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the effect of BPs on the gene expression of cultured human osteoblasts. After 24 h of culture with the BP at the corresponding dose, an 0.05 % trypsin-EDTA solution (Sigma) was used to detach the cells. The Qiagen RNeasy kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) was used for mRNA extraction in accordance with kit instructions. The amount of mRNA extracted was measured by UV spectrophotometry at 260 nm (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and contamination with proteins was determined according to the 260/280 ratio. Next, 1 µg mRNA from osteoblasts cultured with each BP at each dose was brought to a total volume of 40 µL reverse-transcribed to cDNA and amplified by PCR using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions⁴⁷.

RT-PCR primers were designed using the NCBI nucleotide library and Primer3-design to detect mRNA of Runx-2, OSX, ALP, OSC, Col-I, BMP-2, or BMP-7 (Table 1). Ubiquitin C (UBC), peptidylprolyl isomerase A (PPIA), and ribosomal protein S13 (RPS13) were used as stable housekeeping genes to normalize the results⁴⁸.

Quantitative RT-PCR (q-RT-PCR) was carried out with the SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit (Bio-Rad laboratories), placing cDNA samples in 96-well microplates and using IQ5-Cycler (Bio-Rad laboratories) to amplify the genetic information. More than 40 cycles were carried out with annealing temperatures ranging from 60 to 65 °C and an elongation temperature of 72 °C. PCR reactions were performed in a total volume of 20 µL, including 5 µL from cDNA samples and 2 µL from the primer. Standard curves were constructed for each gene by plotting Ct values against log cDNA dilution. Nonspecific PCR products and primer dimers were then excluded by creating a melting profile and performing agarose gel electrophoresis. mRNA concentrations for each gene were expressed as ng of mRNA per average ng of housekeeping mRNA ⁴⁹. This assay was performed in triplicate.

Gene	Sense primer	Antisense primer
ALP	5'-CCCATATTCCTGCACTTTG-3'	5' -ACCTTGACCTCTCAGCCTCA-3'
Col-1	5' -CCTCATCGCAGGAGAAAAAG-3'	5' -CCCTGAAGTGACTGGGGTAA-3'
OSC	5' -CCTGGTCCAGACCACAGAGT-3'	5' -TGGAGATTTTGGGAGTACGG-3'
Runx2	5' -CCTTGCTGCTCTACCTCCAC-3'	5' -CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'
OSX	5' -TGCCTAGAAGCCCTGAGAAA-3'	5' -TTTAACTTGGGGCCTTGAGA-3'
BMP-2	5'-TCGAAATTCCTCGTGACCAG-3'	5' -CCACTTCCACCACGAATCCA-3'
BMP-7	5' -CTGGTCTTTGTCTGCAGTGG-3'	5' -GTACCCCTCAACAAGGCTTC-3'

Table 1. Primer sequences for the amplification of osteoblasts' cDNA by RT-PCR.

4.5. Statistical Analysis

mRNA levels were expressed as means \pm SD. The normality of variable distributions was checked with the Kolmogorov–Smirnov test. Data were analyzed using ANOVA with Bonferroni corrections for multiple comparisons. Three cell lines of primary culture human osteoblasts were employed for all experiments, performing at least three experiments in all assays. SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA) was used for data analyses, considering $p < 0.05$ to be significant in all tests.

5. Conclusions

This in vitro study demonstrates that BPA analogs (BPF, BPS, and BPAF) exert adverse effects on the expression of osteogenic markers involved in bone development and may inhibit the formation and mineralization of the bone matrix, with a potentially negative impact on the biomechanical properties of bone. The effects observed for these BPA analogs (BPF, BPS, and BPAF) were not substantively different from those previously reported for BPA itself, suggesting that the utilization of these analogs should be subject to comparable supervision and control measures. Further research is warranted to determine the possible contribution of BP exposure to the development of bone diseases such as osteoporosis.

6. References

1. Rudel, R.A.; Perovich, L.J. Endocrine Disrupting Chemicals in Indoor and Outdoor Air. *Atmospheric Environment* 2009, 43, 170–181, doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.025.
2. Rochefort, H. Endocrine Disruptors (EDs) and Hormone-Dependent Cancers: Correlation or Causal Relationship? *Comptes Rendus Biologies* 2017, 340, 439–445, doi:10.1016/j.crv.2017.07.007.
3. Abraham, A.; Chakraborty, P. A Review on Sources and Health Impacts of Bisphenol A. *Rev Environ Health* 2020, 35, 201–210, doi:10.1515/reveh-2019-0034.
4. Rochester, J.R.; Bolden, A.L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect* 2015, 123, 643–650, doi:10.1289/ehp.1408989.
5. Rosenfeld CS Neuroendocrine Disruption in Animal Models Due to Exposure to Bisphenol A Analogues. *Frontiers in neuroendocrinology* 2017, 47, doi:10.1016/j.yfrne.2017.08.001.
6. Pelch, K.; Wignall, J.A.; Goldstone, A.E.; Ross, P.K.; Blain, R.B.; Shapiro, A.J.; Holmgren, S.D.; Hsieh, J.-H.; Svoboda, D.; Auerbach, S.S.; *et al.* A Scoping Review of the Health and Toxicological Activity of Bisphenol A (BPA) Structural Analogues

- and Functional Alternatives. *Toxicology* 2019, 424, 152235, doi:10.1016/j.tox.2019.06.006.
7. den Braver-Sewradj, S.P.; van Spronsen, R.; Hessel, E.V.S. Substitution of Bisphenol A: A Review of the Carcinogenicity, Reproductive Toxicity, and Endocrine Disruption Potential of Alternative Substances. *Crit Rev Toxicol* 2020, 50, 128–147, doi:10.1080/10408444.2019.1701986.
 8. Shamhari, A. 'Afifah; Abd Hamid, Z.; Budin, S.B.; Shamsudin, N.J.; Taib, I.S. Bisphenol A and Its Analogues Deteriorate the Hormones Physiological Function of the Male Reproductive System: A Mini-Review. *Biomedicines* 2021, 9, 1744, doi:10.3390/biomedicines9111744.
 9. Hwang, J.K.; Min, K.H.; Choi, K.H.; Hwang, Y.C.; Jeong, I.-K.; Ahn, K.J.; Chung, H.-Y.; Chang, J.S. Bisphenol A Reduces Differentiation and Stimulates Apoptosis of Osteoclasts and Osteoblasts. *Life Sciences* 2013, 93, 367–372, doi:10.1016/j.lfs.2013.07.020.
 10. Thent, Z.C.; Froemming, G.R.A.; Ismail, A.B.M.; Fuad, S.B.S.A.; Muid, S. Employing Different Types of Phytoestrogens Improve Bone Mineralization in Bisphenol A Stimulated Osteoblast. *Life Sciences* 2018, 210, 214–223, doi:10.1016/j.lfs.2018.08.057.
 11. García-Recio, E.; Costela-Ruiz, V.J.; Melguizo-Rodríguez, L.; Ramos-Torrecillas, J.; García-Martínez, O.; Ruiz, C.; de Luna-Bertos, E. Repercussions of Bisphenol A on the Physiology of Human Osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 5349, doi:10.3390/ijms23105349.
 12. Thent, Z.C.; Froemming, G.R.A.; Muid, S. Bisphenol A Exposure Disturbs the Bone Metabolism: An Evolving Interest towards an Old Culprit. *Life Sci* 2018, 198, 1–7, doi:10.1016/j.lfs.2018.02.013.
 13. Chin, K.-Y.; Pang, K.-L.; Mark-Lee, W.F. A Review on the Effects of Bisphenol A and Its Derivatives on Skeletal Health. *Int J Med Sci* 2018, 15, 1043–1050, doi:10.7150/ijms.25634.
 14. Long, F. Building Strong Bones: Molecular Regulation of the Osteoblast Lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 13, 27–38, doi:10.1038/nrm3254.
 15. Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014, 561, 3–12, doi:10.1016/j.abb.2014.05.003.

16. Roeder, E.; Matthews, B.G.; Kalajzic, I. Visual Reporters for Study of the Osteoblast Lineage. *Bone* 2016, 92, 189–195, doi:10.1016/j.bone.2016.09.004.
17. Komori, T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells* 2020, 43, 168–175, doi:10.14348/molcells.2019.0244.
18. Salazar, V.S.; Gamer, L.W.; Rosen, V. BMP Signalling in Skeletal Development, Disease and Repair. *Nat Rev Endocrinol* 2016, 12, 203–221, doi:10.1038/nrendo.2016.12.
19. Komori, T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci* 2019, 20, E1694, doi:10.3390/ijms20071694.
20. Chan, W.C.W.; Tan, Z.; To, M.K.T.; Chan, D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 5445, doi:10.3390/ijms22115445.
21. Xu, B.; Wang, X.; Wu, C.; Zhu, L.; Chen, O.; Wang, X. Flavonoid Compound Icariin Enhances BMP-2 Induced Differentiation and Signalling by Targeting to Connective Tissue Growth Factor (CTGF) in SAMP6 Osteoblasts. *PLoS One* 2018, 13, e0200367, doi:10.1371/journal.pone.0200367.
22. Gomathi, K.; Akshaya, N.; Srinaath, N.; Moorthi, A.; Selvamurugan, N. Regulation of Runx2 by Post-Translational Modifications in Osteoblast Differentiation. *Life Sci* 2020, 245, 117389, doi:10.1016/j.lfs.2020.117389.
23. Beederman, M.; Lamplot, J.D.; Nan, G.; Wang, J.; Liu, X.; Yin, L.; Li, R.; Shui, W.; Zhang, H.; Kim, S.H.; *et al.* BMP Signaling in Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Bone Formation. *J Biomed Sci Eng* 2013, 6, 32–52, doi:10.4236/jbise.2013.68A1004.
24. Bayat, M.; Momen Heravi, F.; Mahmoudi, M.; Bahrami, N. Bone Reconstruction Following Application of Bone Matrix Gelatin to Alveolar Defects: A Randomized Clinical Trial. *Int J Organ Transplant Med* 2015, 6, 176–181.
25. Seo, S.-J.; Bark, C.W.; Lim, J.-H.; Kim, Y.-G. Bone Dynamics in the Upward Direction after a Maxillary Sinus Floor Elevation Procedure: Serial Segmentation Using Synchrotron Radiation Micro-Computed Tomography. *Int J Nanomedicine* 2015, 10 Spec Iss, 129–136, doi:10.2147/IJN.S88282.
26. Kelly, M.P.; Vaughn, O.L.A.; Anderson, P.A. Systematic Review and Meta-Analysis of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Localized Alveolar

- Ridge and Maxillary Sinus Augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2016, 74, 928–939, doi:10.1016/j.joms.2015.11.027.
27. Lin, G.-H.; Lim, G.; Chan, H.-L.; Giannobile, W.V.; Wang, H.-L. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 Outcomes for Maxillary Sinus Floor Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Oral Implants Res* 2016, 27, 1349–1359, doi:10.1111/clr.12737.
 28. M, M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2018, 8, doi:10.1101/cshperspect.a031229.
 29. Siller, A.F.; Whyte, M.P. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res* 2018, 33, 362–364, doi:10.1002/jbmr.3225.
 30. Karpen, H.E. Mineral Homeostasis and Effects on Bone Mineralization in the Pre-term Neonate. *Clin Perinatol* 2018, 45, 129–141, doi:10.1016/j.clp.2017.11.005.
 31. Vimalraj, S. Alkaline Phosphatase: Structure, Expression and Its Function in Bone Mineralization. *Gene* 2020, 754, 144855, doi:10.1016/j.gene.2020.144855.
 32. Kalajzic, I.; Kalajzic, Z.; Kaliterna, M.; Gronowicz, G.; Clark, S.H.; Lichtler, A.C.; Rowe, D. Use of Type I Collagen Green Fluorescent Protein Transgenes to Identify Subpopulations of Cells at Different Stages of the Osteoblast Lineage. *J Bone Miner Res* 2002, 17, 15–25, doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.15.
 33. Siddiqui, J.A.; Partridge, N.C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)* 2016, 31, 233–245, doi:10.1152/physiol.00061.2014.
 34. Li, H.; Xiao, Z.; Quarles, L.D.; Li, W. Osteoporosis: Mechanism, Molecular Target and Current Status on Drug Development. *Curr Med Chem* 2021, 28, 1489–1507, doi:10.2174/0929867327666200330142432.
 35. Bousoumah, R.; Leso, V.; Iavicoli, I.; Huuskonen, P.; Viegas, S.; Porras, S.P.; Santonen, T.; Frery, N.; Robert, A.; Ndaw, S. Biomonitoring of Occupational Exposure to Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F: A Systematic Review. *Science of The Total Environment* 2021, 783, 146905, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146905.
 36. Liao, C.; Liu, F.; Guo, Y.; Moon, H.-B.; Nakata, H.; Wu, Q.; Kannan, K. Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environ Sci Technol* 2012, 46, 9138–9145, doi:10.1021/es302004w.

37. Liao, C.; Liu, F.; Kannan, K. Bisphenol s, a New Bisphenol Analogue, in Paper Products and Currency Bills and Its Association with Bisphenol a Residues. *Environ Sci Technol* 2012, 46, 6515–6522, doi:10.1021/es300876n.
38. Liao, C.; Kannan, K. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *J Agric Food Chem* 2013, 61, 4655–4662, doi:10.1021/jf400445n.
39. Lane, R.F.; Adams, C.D.; Randtke, S.J.; Carter, R.E. Chlorination and Chloramination of Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol A Diglycidyl Ether in Drinking Water. *Water Research* 2015, 79, 68–78, doi:10.1016/j.watres.2015.04.014.
40. Li, J.; Wu, C.; Zhao, H.; Zhou, Y.; Cao, G.; Yang, Z.; Hong, Y.; Xu, S.; Xia, W.; Cai, Z. Exposure Assessment of Bisphenols in Chinese Women during Pregnancy: A Longitudinal Study. *Environ Sci Technol* 2019, 53, 7812–7820, doi:10.1021/acs.est.9b01281.
41. González, N.; Cunha, S.C.; Monteiro, C.; Fernandes, J.O.; Marquès, M.; Domingo, J.L.; Nadal, M. Quantification of Eight Bisphenol Analogues in Blood and Urine Samples of Workers in a Hazardous Waste Incinerator. *Environ Res* 2019, 176, 108576, doi:10.1016/j.envres.2019.108576.
42. Jin, H.; Zhu, J.; Chen, Z.; Hong, Y.; Cai, Z. Occurrence and Partitioning of Bisphenol Analogues in Adults' Blood from China. *Environ Sci Technol* 2018, 52, 812–820, doi:10.1021/acs.est.7b03958.
43. Lehmler, H.-J.; Liu, B.; Gadogbe, M.; Bao, W. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. *ACS Omega* 2018, 3, 6523–6532, doi:10.1021/acsomega.8b00824.
44. Salari, N.; Ghasemi, H.; Mohammadi, L.; Behzadi, M.H.; Rabieenia, E.; Shohaimi, S.; Mohammadi, M. The Global Prevalence of Osteoporosis in the World: A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis. *J Orthop Surg Res* 2021, 16, 609, doi:10.1186/s13018-021-02772-0.

45. García-Martínez, O.; Díaz-Rodríguez, L.; Rodríguez-Pérez, L.; De Luna-Bertos, E.; Reyes Botella, C.; Ruiz, C.C. Effect of Acetaminophen, Ibuprofen and Methylprednisolone on Different Parameters of Human Osteoblast-like Cells. *Arch Oral Biol* 2011, 56, 317–323, doi:10.1016/j.archoralbio.2010.10.018.
46. Melguizo-Rodríguez, L.; Costela-Ruiz, V.J.; Manzano-Moreno, F.J.; Illescas-Montes, R.; Ramos-Torrecillas, J.; García-Martínez, O.; Ruiz, C. Repercussion of Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Gene Expression of Human Osteoblasts. *PeerJ* 2018, 6, e5415, doi:10.7717/peerj.5415.
47. Melguizo-Rodríguez, L.; Illescas-Montes, R.; Costela-Ruiz, V.J.; Ramos-Torrecillas, J.; de Luna-Bertos, E.; García-Martínez, O.; Ruiz, C. Antimicrobial Properties of Olive Oil Phenolic Compounds and Their Regenerative Capacity towards Fibroblast Cells. *J Tissue Viability* 2021, 30, 372–378, doi:10.1016/j.jtv.2021.03.003.
48. Ragni, E.; Viganò, M.; Rebullà, P.; Giordano, R.; Lazzari, L. What Is beyond a QRT-PCR Study on Mesenchymal Stem Cell Differentiation Properties: How to Choose the Most Reliable Housekeeping Genes. *J Cell Mol Med* 2013, 17, 168–180, doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01660.x.
49. Manzano-Moreno, F.J.; Ramos-Torrecillas, J.; Melguizo-Rodríguez, L.; Illescas-Montes, R.; Ruiz, C.; García-Martínez, O. Bisphosphonate Modulation of the Gene Expression of Different Markers Involved in Osteoblast Physiology: Possible Implications in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Int J Med Sci* 2018, 15, 359–367, doi:10.7150/ijms.22627.

CONCLUSIONES

1. La exposición al BPA altera diferentes parámetros de los osteoblastos humanos en cultivo al inhibir el crecimiento celular por inducción de apoptosis. A nivel de la diferenciación y/o maduración celular, disminuye la síntesis de ALP e inhibe el proceso de mineralización. Igualmente, el BPA conduce a la modulación de la expresión de los antígenos CD54 y CD80, a la inhibición de la capacidad fagocítica y a alteraciones en la expresión de los marcadores osteogénicos ALP, Col-1, OSC, Runx2, OSX, BMP-2 y BMP-7.
2. Los estudios *in vitro* realizados muestran que los osteoblastos humanos en presencia del BPA a las dosis de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M presentan una alteración importante en la fisiología de esta población celular, la cual desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la salud ósea.
3. El estudio de los análogos del BPA (BPS, BPF y BPAF) muestra que el BPS inhibe la proliferación a las distintas dosis ensayadas (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M) de manera dosis dependiente, mientras que el BPF solo la inhibe a la dosis más elevada (10^{-5}). No mostrando efecto sobre la proliferación la presencia de BPAF. La inhibición observada en el crecimiento está en relación con la inducción de apoptosis. A nivel de la diferenciación y/o maduración del osteoblasto los tres análogos del BPA ensayados inhibieron la síntesis de ALP y de la mineralización.
4. El BPF, el BPS y el BPAF inhiben la expresión de los principales marcadores osteogénicos implicados en el desarrollo óseo (ALP, Col-1, OSC, Runx2, OSX, BMP-2 y BMP-7), ejerciendo un efecto adverso sobre el osteoblasto al estar dichos marcadores estrechamente relacionados con la formación y mineralización de la matriz ósea.

5. Los efectos observados del BPA y sus análogos sobre el osteoblasto revelan que estos análogos no están exentos de efectos adversos, lo que aconseja que su utilización debe estar sujeta a medidas de supervisión y control comparables a las aplicadas al BPA. Por otra parte, nuestros datos alertan de que la elevada sobre exposición a estos EDCs puede estar contribuyendo a la prevalencia de patologías óseas, como su consecuencia de la alteración que dichas sustancias producen en la fisiología del osteoblasto.

ABREVIATURAS

ALP: Fosfatasa alcalina

BMP: Proteína morfogenética ósea

BPA: Bisfenol A

BPAF: Bisfenol AF

BPF: Bisfenol F

BPS: Bisfenol S

BSP: Sialoproteína ósea

CAS: *Chemical Abstract Service*

CE: Consejo Europeo

Col-1: Colágeno tipo 1

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

EDC: Disruptor endocrino

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IL: Interleuquina

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MS: Espectrometría de masas

MSC: Célula madre mesenquimal

OPN: Osteopontina

OSC: Osteocalcina

OSX: Osterix

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFAS: Sustancias perfluoroalquiladas/polifluoroalquiladas

PGE2: Prostaglandina E2

PTH: Parathormona

RANK: Receptor activador del factor nuclear κ B

RANKL: Ligando del RANK.

RD: Real Decreto

RE: Receptor de estrógenos

RIC: Código Identificador de Resina

SIBLING: *Small Integrin-Binding Ligand, N-Linked Glycoprotein*

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta

UE: Unión Europea