



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“La exposición a Bisfenol A, S, AF y F induce la producción de
especies reactivas de oxígeno e IL-6 en células endoteliales humanas
HUVEC EA. Hy926”**

T E S I S

Que presenta

BQD. VANESSA MORILLÓN TORRES

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

en la especialidad de Toxicología

Co-directoras de Tesis:

Dra. María del Rocío Gómez Ortega

Dra. Emma S. Calderón Aranda

Ciudad de México

Agosto 2024

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Gómez Ortega y la Dra. Emma Calderón Aranda, en los laboratorios a su cargo, en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Este trabajo fue financiado por los proyectos Frontera CF-2023-G-726 (M.R.G.O.) y Conacyt-CB-A1-S-32913 (E.S.C.A.) y se contó con el apoyo de la beca de maestría 831674 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT).

Agradecimientos

A mis Directoras de Tesis, a la Dra. María del Rocío Gómez Ortega y la Dra. Emma S. Calderón Aranda. Doctoras, muchas gracias por haber depositado su confianza y enseñanzas en mi, por abrirme las puertas de sus laboratorios y por siempre guiarme y apoyarme durante mi estancia.

A mis asesoras, a la Dra. Libia Vega Loyo y a la Dra. Aurora de la Peña Diaz. Gracias por todas sus observaciones y aportaciones durante la realización de este proyecto.

A todos los miembros de los laboratorios 13 y 14 del Departamento de Toxicología por enseñarme, asistirme y apoyarme durante el desarrollo de mi Tesis.

A mis compañeras de generación, Yuri, Ángeles e Itzel, gracias por acompañarme, aconsejarme, apoyarme y confiar incondicionalmente en mi.

A mi familia, a mi hermano Nolan, a mi mamá y a mi papá, por siempre ser mi fuente de motivación y mi más grande aliento. Gracias por siempre impulsarme a alcanzar mis sueños y estar presentes en cada uno de mis logros.

CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares	11
1.2 Fisiopatología del endotelio vascular	12
1.2.1 Activación del endotelio	12
1.2.2 Activación del endotelio por especies reactivas de oxígeno.....	13
1.2.3 Aterogénesis	14
1.3 Factores de susceptibilidad y riesgo relacionados con el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares	14
1.4 Bisfenoles y riesgo cardiovascular.....	17
1.5 Sustitutos del BPA.....	20
1.6 Justificación.....	22
1.7 Hipótesis	23
1.8 Objetivos	23
1.8.3 Objetivo General	23
1.8.4 Objetivos Particulares	23
2. MÉTODOS	24
2.1 Estrategia Experimental	24
2.2 Materiales y métodos.....	25
2.2.1 Cultivo celular.....	25
2.2.2 Tratamientos	25
2.2.3 Viabilidad Celular	25
2.2.5 Determinación de anión superóxido mitocondrial con MitoSOX	27

2.2.6	Determinación de la secreción de citocinas proinflamatorias por ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.....	28
2.2.7	Análisis Estadístico	29
3.	RESULTADOS.....	30
3.1	Los bisfenoles afectan diferencialmente la viabilidad celular.....	30
3.2	La exposición a bisfenoles incrementa diferencialmente la producción de especies reactivas de oxígeno celulares	32
3.3	La exposición bisfenoles incrementa diferencialmente la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales	34
3.4	La exposición a bisfenoles afecta la secreción de IL-6.....	36
4.	DISCUSIÓN	38
5.	CONCLUSIONES	45
6.	PERSPECTIVAS.....	45
7.	REFERENCIAS.....	46

RESUMEN

Las **enfermedades cardiovasculares (ECV)** representan la primera causa de muerte a nivel global, teniendo como piedra angular a la formación de la **placa ateroescleótica** a la que subyace la **disfunción endotelial**. Ésta inicia con la activación del endotelio vascular y la inducción de un proceso proinflamatorio, que altera la permeabilidad endotelial y favorece la formación de la placa. La exposición ambiental ha tenido un papel relevante en la formación de placa y en los últimos años se ha demostrado que el **Bisfenol A (BPA)**, un disruptor endócrino, contribuye al desarrollo de ECV's. Como alternativa a los diversos usos del BPA, se ha propuesto su sustitución por los Bisfenoles de Nueva Generación (**BNGs**). No obstante, la información para sustentar su uso seguro es escasa. El objetivo del presente proyecto fue estudiar el efecto de la exposición a BPA y a los BNGs en células del endotelio vascular (**HUVEC EA.hy926**). Dicho efecto se evaluó sobre: 1) la viabilidad celular, 2) la producción de especies reactivas de oxígeno (**ROS**), y 3) la capacidad de inducir la secreción de IL-6, un marcador de inflamación. Nuestros resultados mostraron que el BPA y los BNGs -a concentraciones no citotóxicas- **afectaron diferencialmente** la función de las células HUVEC EA.hy926. Para el caso de la viabilidad celular, las concentraciones de 3.5 y 35 μM de BPA, BPS y BPF, y 0.8 y 1.7 μM de BPAF no la afectaron. Con respecto a la producción de ROS por los BNGs, ésta se incrementó hasta 1.4 veces, más que el control, a las 3 h y 6 h. Tanto el BPA como el BPF incrementaron la secreción de IL-6 con respecto al control, el BPS la disminuyó y el BPAF no la afectó. Estos datos sugieren que los BNGs tienen el **potencial de provocar disfunción endotelial** en menor o mayor grado que el BPA por lo que podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD), the leading cause of death worldwide, are after **atherosclerotic plaque formation** triggered by **endothelial dysfunction**. Endothelial dysfunction starts with activation of the vascular endothelium, inducted through a pro-inflammatory process, altering the endothelial permeability and promoting plaque formation. **Bisphenol A (BPA)**, an endocrine disruptor, has been associated with the CVDS's development. Thus, it is being replaced with the New Generation Bisphenols (**NGBs**), whose information about its safe use is limited hitherto. The effect of exposure to BPA and NGBs on vascular endothelial cells (**HUVEC EA.hy926**) was explored in the present study. Such effect was evaluated through three features: 1) cell viability, 2) production of reactive oxygen species (**ROS**), and 3) the ability to induce inflammation (IL-6 secretion). BPA, BPS and BPF (3.5 and 35 μM), and BPAF (0.8 and 1.7 μM) did not affect cell viability. Regarding ROS, NGBs increased their production by up to 1.4 times compared to the control at 3 and 6 hours. Regarding inflammation, both BPA and BPF increased IL-6 secretion; BPS decreased its production, whereas BPAF did not provoke any effect. Summarising, our findings demonstrated that BPA and NGPs, at non-cytotoxic concentrations, **differentially affect** the function of HUVEC EA.hy926 cells. These data suggest that NGPs have the potential to cause endothelial dysfunction to a greater or lesser extent than BPA and in turn these endocrine disruptors could contribute to CVDs development.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son patologías que afectan el corazón, los vasos sanguíneos y el pericardio. A pesar de que sus manifestaciones clínicas no se presentan hasta la edad adulta, las ECV inician su desarrollo desde la infancia (Li, et al, 2023; Canas, et al, 2013; Boot, et al, 2020). Las enfermedades cardiovasculares incluyen a la enfermedad isquémica del corazón, a los eventos vasculares cerebrales y al tromboembolismo venoso (Global burden, 2022; NCBI, 2023). A nivel mundial, las ECVs tienen una prevalencia mundial de más de 500 millones de casos anuales, contribuyendo con más de 18 millones de defunciones cada año, siendo la principal causa de muerte a nivel mundial y nacional además de ser una de las principales causas de discapacidad (WHO, 2023). En las estadísticas nacionales, las ECV ocupan el primer lugar en mortalidad nacional y estatal. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, en el periodo de enero a junio del 2022, en México se reportaron más de 105 mil casos de defunción por ECVs, seguidas de la diabetes tipo 2 y los tumores malignos (INEGI, 2023).

Las ECVs tienen como piedra angular a la **aterotrombosis**, un desorden crónico y progresivo de la **aterosclerosis**, que involucra alteraciones en la respuesta inflamatoria, la coagulación, el estrés oxidativo y el metabolismo de lípidos, entre otras, lo que conlleva a la formación de la placa aterosclerótica (Camacho-Mejorado, et al, 2020). La placa aterosclerótica, se forma por la acumulación de lípidos, elementos fibrosos, calcificación y vasoconstricción de los vasos capilares grandes, como consecuencia de una previa **disfunción del endotelio vascular** (Camacho-Mejorado, et al, 2020; CUN, 2021; Jebari-Benslaiman, et al, 2022).

1.2 Fisiopatología del endotelio vascular

El endotelio vascular (EV), es una monocapa de células endoteliales dispuestas en la superficie del lumen de los vasos sanguíneos, por lo que están en contacto directo con los componentes de la sangre. Este constituye una barrera celular de permeabilidad restringida, encargada de llevar a cabo la extravasación selectiva de solutos a los tejidos (Wautier & Wautier, 2022). Además de constituir una barrera entre los tejidos y el contenido sanguíneo, el **EV es considerado un órgano endócrino** que libera sustancias que controlan la relajación y la contracción vascular, pero también la trombogénesis, la fibrinólisis, y la activación/inhibición de mecanismos inflamatorios (Bonacina & Norata, 2023). Entre las sustancias vasoactivas que controlan la relajación destacan el óxido nítrico (NO^*), la prostaciclina I₂ y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. El EV también desempeña una serie de funciones relacionadas con la respuesta inmune, dentro de las que se encuentran: la producción de citocinas, endocitosis celular y bacteriana, presentación de antígenos, reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a muerte (DAMPs), entre otros. Recientemente, el EV está siendo considerado como **un células de la inmunidad innata** (Xu, et al, 2022).

1.2.1 Activación del endotelio

Dentro de las funciones fundamentales del endotelio, se encuentra el mantener la permeabilidad, la trombosis y la inflamación local en niveles mínimos. Cuando el EV es sometido a un insulto o estímulo, como el estrés oxidante, agentes microbiológicos o insultos ambientales, se inducen cambios fenotípicos. Dichos cambios permiten inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos y/o llevar a cabo el reclutamiento de células inmunes, expresando un fenotipo proinflamatorio (Immanuel & Yun, 2023). Dependiendo del estímulo, el EV se puede activar a través de dos vías (Immanuel & Yun, 2023):

1. **La activación endotelial de tipo I**, caracterizada por respuestas rápidas y pasajeras como la liberación de calcio intracelular y la contracción del citoesqueleto de actina, permitiendo la proyección luminal de P-selectina y la liberación de los cuerpos Weibel-Palade.
2. **La activación endotelial de tipo 2, en la cual se** requiere de la síntesis proteica *de novo*, induciendo un aumento en la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la proteína quimiotáctica 1 del factor de migración de monocitos macrófagos (MCP-1), que son proteínas asociadas al reclutamiento y adhesión leucocitaria ante un insulto.

1.2.2 Activación del endotelio por especies reactivas de oxígeno

Existen diversas maneras de activar al endotelio, ya sea por un insulto externo, como la tensión de cizallamiento, o bien, por un desequilibrio en el ambiente oxidante de las células. Particularmente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) conlleva a la alteración de la permeabilidad endotelial, favoreciendo la entrada y oxidación de moléculas de lípidos de baja densidad (LDL) presentes en la sangre y en el espacio subepitelial. **Dentro de las células endoteliales, las oxLDL forman grandes agregados lipídicos que inducen la activación endotelial, lo que resulta en la expresión de moléculas de adhesión (MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1), mediante NF-κB y AP-1 y de igual manera, dando lugar a la respuesta inflamatoria en el sitio de la lesión (Immanuel & Jun, 2023).** El aumento en la moléculas de adhesión atrae monocitos circulantes, células dendríticas y linfocitos al espacio subendotelial. Son los macrófagos diferenciados a partir de los monocitos los que fagocitan a las oxLDL, convirtiéndose en células espumosas que contienen una sobrecarga de colesterol esterificado. Dado que las oxLDL no se degradan con facilidad, las células espumosas, dan origen a la **estría grasa**, la que representa el **primer indicio patológico para el desarrollo de la placa aterosclerótica (Bonafiglia, et al, 2022).**

1.2.3 Aterogénesis

Las lesiones ateroscleróticas son consecuencia de una acumulación de lípidos que se producen desde las primeras etapas de la vida. Dicha acumulación compromete la integridad del EV, disminuyen la superóxido dismutasa e incrementando la producción de ROS (Zheng, et al, 2022). Simultáneo a la formación de la estría grasa, los macrófagos reclutados por el endotelio activado, secretan interleucinas (IL) proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, e IL-18), así como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) e interferon gamma (IFN- γ) (Henein, et al, 2022; Leopold & Loscazo, 2008). Estos eventos asociados con la activación del endotelio, dan lugar a otros procesos complejos que contribuyen a la fisiopatología de la trombosis, con un papel central en el desarrollo de las ECVs.

1.3 Factores de susceptibilidad y riesgo relacionados con el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares

Por definición, las ECVs son condiciones multifactoriales y genéticamente heterogéneas en las que el alto índice de masa corporal (sobrepeso y obesidad), alteraciones en el metabolismo de los lípidos, la hiperglicemia y la hipertensión arterial son considerados factores de riesgo patológicos (Li, et al, 2023). Para fines de estudio, los factores de riesgo se dividen en dos tipos: 1) **no modificables** como la carga genética, la edad y el género (Tabla 1) **los factores modificables**, como el estilo de vida, la dieta, la ingesta de alcohol y/o tabaco, el sedentarismo y la exposición ambiental a disruptores endocrinos (Tabla y 2) (Brown, Gerhardt, Kwon, 2023).

Tabla 1. Factores de riesgo asociados al desarrollo de las ECV's

Factores de Riesgo no modificables		
Factor	Contribución	Referencia
Genético	HR= 1.91 (95%IC: 1.75-2.09)	Semaev, & Shakhtshneider, 2020.
Edad	IM 20-49 años IR: 4.1 (95%IC: 3.9–4.3) 50-59 años IR: 10.6 (95%IC:10.2–11.1) 60-75 años IR:16.3 (95%IC:15.4–17.2)	Kaneko, et al, 2023
Género	MI Mujeres (56 +/- 8) HR: 2.88 (2.34 to 3.41) Hombres (56 +/- 8) 14.02 (11.93 to 16.11)	Millet, Peters & Woodward, 2018
Factores de Riesgo Modificables		
Dieta	Alta en carbohidratos y grasas saturadas RR = 1.35 (95%IC: 1.11–1.63) Dieta de alta calidad RR = 0.70 (95%IC: 0.57–0.87)	Chareonrungrueangchai, et al, 2020
Sedentarismo	HR=1.14 (95%IC, 1.09–1.19)	Lavie, et al, 2019
Consumo de alcohol	RR=1.75 (95%IC =1.36-2.25)	Roerecke, 2021
Consumo de tabaco	Hemorragia subaranoide (RR=2.93, 95%IC=2.48-3.46) ECV (RR=1.92, 95%IC= 1.71- 2.16)	Kondo, et al, 2019.
Obesidad	Mujeres HR: 1.61 (95%IC: 1.41-1.83) Hombres HR: 1.73 (95%IC: 1.57-1-90)	Millet, Peters & Woodwars, 2018

Otro tipo de factores de riesgo, que no es posible incluir del todo dentro de las dos categorías mencionadas previamente, corresponden a los derivados de la **exposición ambiental**. En el ambiente, existe un gran número de compuestos con diferentes tipos y grados de repercusión negativa en el organismo. Dentro de éstos podemos encontrar a los metales, los compuestos organoclorados y organofosforados y los derivados industriales textiles, tecnológicos y plásticos, por mencionar solo algunos (Darbre, 2018). Estos compuestos tienen diversos efectos tóxico en el organismo, desde síntomas leves y temporales como dermatitis, asma

y problemas de la mucosa, hasta efectos a nivel de diferentes órganos y sistemas relacionados con sus propiedades proinflamatorias, carcinogénicas y de disrupción endocrina (Darbre, 2018). Un disruptor endocrino (EDC) es cualquier sustancia química exógena capaz de alterar el equilibrio hormonal. Consecuentemente, puede interferir con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción y/o eliminación de las hormonas en el organismo (Pompo et al, 2020; Kristanc & Kreft, 2016). De forma general, estos compuestos actúan mediante cuatro mecanismos principales (Pompo, et al, 2020):

- 1) Mimetizándose con las hormonas y uniéndose a los receptores membranales y/o nucleares.
- 2) Como antagonistas hormonales.
- 3) Alterando el patrón de síntesis y transporte de hormonas
- 4) Modulando el metabolismo y secreción endocrina correspondiente.

Algunos EDCs se encuentran de manera natural como fitoestrógenos, derivados de plantas, o micoestrógenos, derivados de hongos. Sin embargo, la mayoría son compuestos antropogénicos liberados al medio ambiente por las actividades humana (Darbre, 2019). La exposición a estos compuestos ha sido relacionada con el desarrollo de las ECVs, alterandolos niveles lipídicos, así como a la formación de la placa aterosclerótica. Dentro de los EDCs se encuentran a los pesticidas organoclorados, metales como el plomo y cadmio, los ftalatos y los bisfenoles (Tabla 2) (Fu, et al, 2020).

Tabla 2. Disruptores endocrinos asociados al desarrollo de las ECV's

Compuesto	Contribución	Referencia
Pesticidas organoclorados	OR = 1.12, (95% IC: 1.00-1.24)	Fu, et al, 2020
Plomo	RR=1.30 (95% IC: 1.04 to 1.63)	Chowdhury, et al, 2018
Ftalatos	OR= 1.11 (95% IC: 1.06-1.17)	Fu, et al, 2020
BPA	OR = 1.97 (95%IC: 1.05-3.70)	Hu, et al, 2019

1.4 Bisfenoles y riesgo cardiovascular

Los bisfenoles son un grupo de compuestos químicos que se utilizan ampliamente en la industria para conferir firmeza a los plásticos. Su estructura química esta conformada por dos grupos fenol unidos mediante átomos de carbono o azufre, dependiendo del tipo de bisfenol sus principales sustituyentes son metil, etil, carbonil y trifluorometil ([Frankowski et al, 2020](#)). En la Figura 1 se presenta la estructura del bisfenol A (BPA), el cual es uno de los bisfenoles más empleados y fue sintetizado por primera vez en 1891 en Alemania. Su producción mundial anual es de alrededor de 5,500 libras, siendo el consumo de alimentos o bebidas provenientes de contenedores fabricados con este compuesto la principal fuente de exposición ([CDC, 2017](#)). Los principales usos del BPA son como retardante de flama, en la elaboración del papel térmico, filtros de tabaco, cemento dental, en envases de comida, latas, equipos médicos, micas de lentes y equipo de seguridad, entre otros ([Dias, et al, 2022](#); [Hartman, 2022](#)).

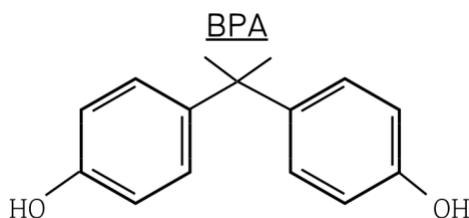


Figura 1 Estructura del BPA

En los últimos años se ha comprobado que el BPA es un disruptor endócrino que induce estrés oxidante, además de que posee cualidades genotóxicas y proinflamatoria contribuyendo al desarrollo de las ECVs y de otras patologías crónicas, por lo que su uso ha sido restringido en diferentes países ([Liu, et al, 2020](#); [Reinieke, 2023](#); [Shrivastav, A., Swetanshu, & Singh, P., 2024](#)). Si bien, el BPA ingresa al organismo por vía dérmica, inhalatoria y oral, es la vía oral la que contribuye con $\approx 90\%$ de la exposición total a este compuesto ([Huang, et al, 2017](#)). Una vez en el intestino, el BPA es absorbido a través del efecto del primer paso, al hígado, en donde, puede ser hidroxilándose en el hígado por el citocromo P450 (CYP) o bien, ser glucuronidado o sulfatado a través de reacciones de fase II; la

enzima UDP glucoronil transferasa (**UGT**), forma Glucuronido de BPA y las enzimas sulfotransferasas (**SULT**) forman BPA sulfato (Yalcin, et al, 2016). Ambos metabolitos, son secretados en su mayoría por la orina en un periodo de aproximadamente 6 horas. El BPA ha sido también encontrado en leche materna (0.01 a 380 µg/L), cordón umbilical (0.10 ng/mL), placenta (1.0 to 104.9 ng/g) y líquido amniótico (8.69 ng/mL) (EFSA, 2008; Huang, et al, 2017; Chen, et al, 2016 ; Gao, et al, 2021; Foster, et al, 2019; Adu-Gyamfi, et al, 2022; Tuzimski, T, et al , 2023). Hasta la fecha, no se han reportado dosis de referencia toxicológicas para la exposición a BPA en humanos, sólo en modelos animales. En ratas, se reporta una dosis letal 50 (**DL₅₀**) de 3250 mg/kg, una dosis de efecto adverso no observado (**NOAEL**) de 5 mg/kg y 50 mg/kg para la dosis con efecto adverso mínimo observado (**LOAEL**) y 2 ng/kg/ día para la ingesta diaria admisible (**IDA**) (Karmakar, et al, 2020; Parchet, 2017).

Si bien el tiempo de vida media del BPA es corto en el aire (<1 día) y agua y suelo (\approx 4.5 días), existe una exposición ubicua y constante mediante el consumo de agua y alimentos contenidos en envases de plástico. La liberación del BPA a los alimentos y bebidas ocurre por el contacto de los contenedores con altas temperaturas ($\geq 22^{\circ}\text{C}$) siendo mayor el desprendimiento al contacto con agua. La acides también tiene un papel central en su liberación (pH ácidos ≈ 5), así como el almacenamiento bajo irradiación solar, uso de detergentes alcalinos y el uso repetido de los mismos (Bao, et al, 2020; Khalili Sadrabad, et al, 2023; Le, et al, 2008; Yu, et al, 2019). Dada su distribución ubicua, la exposición al BPA ha sido relacionado con el desarrollo de enfermedades renales, metabólicas, inmunológicas y cardiovasculares, entre otras. En estudios epidemiológicos, la cantidad de BPA excretado en orina se ha asociado con el diagnóstico de ECVs (OR: 1.39 $_{95\%}\text{IC}$: 1.21-1.60), tales como el infarto al miocardio (**IM**) (OR = 1.73, $_{95\%}\text{IC}$ = 1.11–2.69) y accidentes cerebrovasculares (OR = 1,61, $_{95\%}\text{IC}$ = 1.09–2.36) (Melzer et al, 2010, Cai, et al, 2020; Lang, et al, 2008).

En modelos *in vivo* (ratas), se ha reportado que la exposición a BPA desregula el metabolismo de los lípidos, promueve la formación y progresión de la lesión

ateroesclerótica y favorece la hipertensión (ratones ApoE -/-) (Sui, et al, 2014). En conejos WHHL (*watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia*) el BPA se acumula en de tejido adiposo, induce lesiones hepáticas, y la expresión de marcadores de alteración del metabolismo lipídico e inflamación en hígado (Fang, et al, 2014). De igual manera, se ha relacionado con la migración de macrófagos a los sitios de daño así como una disminución significativa en los niveles de NO• y del peso corporal en ratas Wistar (Kim et al, 2014; Aboul Ezz, Khadrawy & Mourad, 2015).

En estudios *in vitro*, la exposición a BPA en adipocitos, hepatocitos, fibroblastos y células madre mesenquimatosas ha demostrado aumentar la producción de ROS mediante la disminución de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa. Asimismo, es capaz de activar la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y el factor nuclear kappa b (NF-κB) y por consiguiente, la transcripción y liberación de citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β, IL-6 (Andersson & Brittebo, 2012; Gassman, 2017; González-Casanova, et al, 2023). En células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), el BPA indujo un aumentó la expresión de ARNm de los genes proangiógenos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) y de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), además de incrementar la producción de NO• y la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y del receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPARβ) (Andersson & Brittebo, 2012;).

En espermatoцитos, se ha comprobado que BPA se puede unir a receptores transmembranales como la integrina αvβ3, receptor acoplado a proteínas G (GPR) y el receptor de estrógenos (ER). Además el BPA puede ingresar a la célula generando un aumento en la producción de ROS y propiciando la fosforilación de MAPK, PI3K (Rahman & Pang, 2019; Sheng, et al, 2019).

Debido a lo anterior, su uso esta siendo restringido y/o prohibido por algunos países como los Estados Unidos de Norte América y Canadá. En los países integrantes de la Unión Europea, desde 2018 el uso del BPA ha sido restringido; Francia ha implementado una prohibición total de éste EDC (EFSA, 2023). En

países asiáticos como China, Corea del Sur y Malasia su uso está prohibido en contenedores en alimento para infantes mientras que en Japón los límites de liberación no deben sobrepasar los 2.5 µg/mL en cualquier contenedor de comida (SGS, 2023;. SGS, 2023; Parkinson, 2022). En Australia, la eliminación de este EDC es voluntaria, mientras que Sudáfrica es el único país del continente africano que cuenta con restricción del uso de BPA en biberones y contenedores de comida para infantes. Dicha restricción también aplica en algunos países de América Latina como Argentina, Brazil, Costa Rica y Ecuador y hasta ahora, **México no cuenta con una regulación del uso de este aditivo** (Rotimi, et al, 2021;SGS, 2023).

1.5 Sustitutos del BPA

Derivado de los efectos adversos del BPA a nivel endocrino, se han introducido modificaciones en su estructura, con el fin de reemplazar al BPA por sustitutos emergentes con distintos sustituyentes conocidos como bisfenoles de nueva generación (BNGs). Entre estos se encuentran el bisfenol AF (BPAF), bisfenol B (BPB), bisfenol E (BPE), bisfenol F (BPF) y bisfenol S (BPS), entre otros (Figura 2). De éstos, el BPS es el que actualmente tiene mayor presencia en el mercado, seguido del BPAF y BPF. Anualmente se producen 44 mil toneladas de BPS, de 100 a 1000 toneladas de BPAF, mientras que para BPF no existen datos oficiales (Frankowski et al, 2020; ChemAnalyst, 2021; ECHA, 2023).

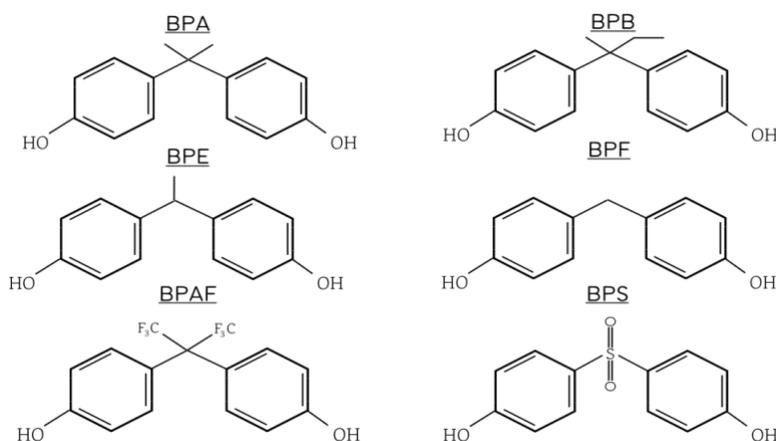


Figura 2. Estructura química de los bisfenoles

Las dosis de referencia toxicológicas se han reportado a través de estudios toxicológicos *in vivo* siendo referenciadas por la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA), (Tabla 3). Sin embargo, a la fecha no existen reportes de LOAEL para BPAF ni DL₅₀ para BPF.

Tabla 3. Dosis de referencia toxicológicas de los BNGs reportadas en roedores

	BPS	BPAF	BPF
NOAEL	60mg/kg	30mg/Kg/día	20mg/Kg
LOAEL	180 mg/kg peso	No reportada	2mg/kg macho 5mg/kg hembras
DL ₅₀	1.6>5g/kg	3400mg/kg	No reportada

Investigaciones recientes, han sugerido que el uso de BNGs podría estar asociado con el desarrollo de ECVs. **Sin embargo, los estudios siguen siendo escasos y los mecanismos por los cuales estos compuestos afectan al endotelio vascular han sido poco estudiados, dando origen al presente proyecto (Wang, 2022).**

1.6 Justificación

Las enfermedades cardiovasculares encabezan la lista de causas de muerte a nivel estatal, nacional y mundial, ocupando los dos primeros lugares en el *top ten* reportado por la Organización Mundial de la Salud. Pese a los avances médicos y tecnológicos, el diagnóstico de las ECVs es cada vez más frecuente en poblaciones jóvenes (≤ 50 años) e incluso infantiles. En el desarrollo de las ECV, subyace la activación del EV y una respuesta inflamatoria persistente aunque de baja intensidad, la cual se asocia al desarrollo de tromboembolismo. Entre los principales factores de riesgo para el desarrollo de estas patologías esta la exposición a contaminantes generados por la industria del plástico en la que el BPA es la materia prima. El BPA es un contaminante ubicuo relacionado con la activación de la respuesta inflamatoria, metabólicas y cardiovascular, por lo que se introdujeron análogos estructurales del BPA como alternativa “segura” denominados BNGs. No obstante, la información que existe acerca de sus efectos sobre la salud cardiovascular es escasa, por lo que se requiere estudiar la capacidad de estos compuestos para inducir activación endotelial en células humanas.

1.7 Hipótesis

La exposición a bisfenoles de nueva generación (BPS, BPAF, BPF) en células endoteliales humanas (HUVEC-EA.hy926) provocará la activación del endotelio hacia un fenotipo inflamatorio y la producción de ROS.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la exposición a bisfenoles de nueva generación (BPS, BPAF y BPF) sobre células del endotelio vascular humano provenientes de la vena umbilical, a través de la producción de ROS y marcadores inflamatorios indicadores de la activación endotelial.

1.8.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto del BPS, BPAF y BPF sobre la viabilidad de las células HUVEC-EA.hy926.
2. Evaluar la capacidad de BPS, BPAF y BPF para inducir el fenotipo inflamatorio en celular del endotelio vascular humano HUVEC-EA.hy926, a través de:
 - 2.1 La producción de especies reactivas de oxígeno celulares y mitocondriales
 - 2.2 La expresión de la citocina proinflamatorias IL-6

2. MÉTODOS

2.1 Estrategia Experimental

La figura 3 resume la estrategia experimental a partir de la cual se determinaron la viabilidad, la producción de ROS y la secreción de IL-6 en células HUVEC EA.hy929 al 80% de confluencia deprivadas durante 17h previas a los distintos tratamientos (Figura 3).

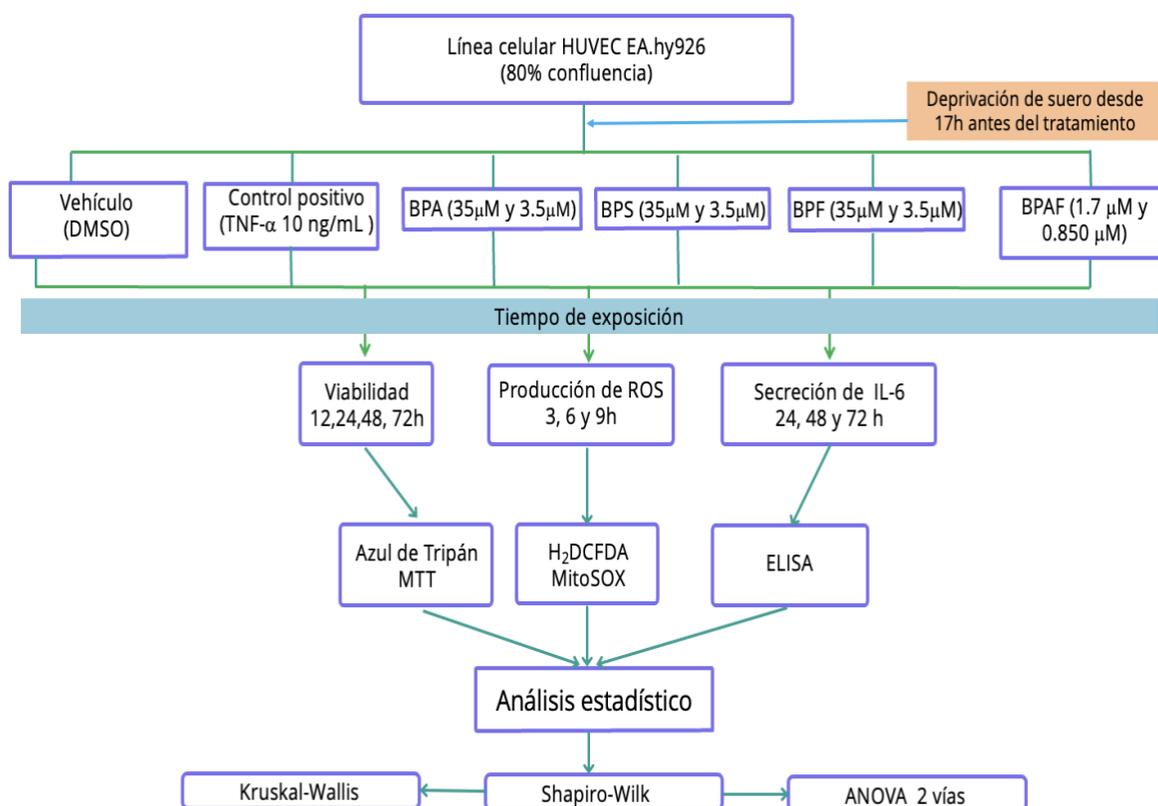


Figura 3. Descripción gráfica de la estrategia experimental.

Células huvec 80% confluentes fueron deprivadas durante 17h posteriormente sometidas a distintos tratamientos. Se determinó la viabilidad, producción de ROS y secreción de IL-6. Posteriormente se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cultivo celular

La línea celular HUVEC EA. hy926, corresponde a células endoteliales obtenidas de la fusión de células primarias de la vena umbilical humana con una clona de células A549 resistente a la tioguanina ([ATCC, 2022](#)). Estas células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (**DMEM**) 1g glucosa ([Capricorn Scientific, Alemania](#)), suplementado con suero fetal bovino (**SFB**) al 10% ([ByProductos, México](#)) y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1% ([Sigma, USA](#)). Las condiciones de incubación empleadas fueron 37°C y CO₂ al 5%.

2.2.2 Tratamientos

Las células se expusieron a diferentes concentraciones (3.5 y 35 µM) de BPA, BPS, BPF y BPAF ([Sigma, USA](#)) (3.5, 1.7 y 0.850 µM) disueltos en Dimetilsulfóxido (**DMSO**) ([Sigma, USA](#)) (concentración final 0.001%) durante diferentes tiempos. La concentraciones de trabajo se determinaron con base en lo reportado para BPA en matrices biológicas como orina o suero (3.5 µM) y matrices ambientales como ríos y sedimentos (35µM). Como control negativo se utilizó el vehículo (**DMSO**) y como control positivo TNF-α (10ng/mL) ([R&D systems, USA](#)).

2.2.3 Viabilidad Celular

La viabilidad celular al tratamiento de los diferentes bisfenoles de nueva generación y el vehículo se llevaron a cabo mediante dos métodos: azul de tripán y bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (**MTT**).

2.2.3.1 Cuento celular- Azul de Tripán

2.2.3.1.1 Fundamento

El azul de tripán es una sal organosulfonada con un peso molecular de 960 g/mol. En condiciones fisiológicas, es incapaz de atravesar la membrana celular, por lo que las células vivas se observan refringentes en el microscopio de contraste de fase; cuando la célula está muerta, este colorante es capaz de atravesar la membrana celular, tiñéndolas de color azul ([Pubchem, 2023](#)).

2.2.3.1.2 Procedimiento

A partir de una suspensión celular de 1 mL, se tomaron 25 μ L que se transfirieron a un tubo de 0.2 mL junto con un volumen igual de azul de Tripán ([Sigma, USA](#)) y 150 μ L del medio de cultivo. Una vez homogeneizada la suspensión, se tomaron 10 μ L los que fueron colocados a cada lado de la cámara de Neubauer. Para llevar a cabo el conteo, se ajustó primero con el objetivo de 4x y con el objetivo 10x se comenzó a contar. Una vez terminado el conteo de ambos lados, las cantidades se sumaron, se dividieron entre ocho y se multiplicaron por cien mil, obteniendo así el número de células en el mililitro de la suspensión celular.

2.2.3.2 MTT

2.2.3.2.1 Fundamento

Este ensayo se basa en la constante actividad mitocondrial presente en las células viables, por lo que, la variación en la viabilidad está directamente relacionado con la actividad mitocondrial. Dicha actividad se mide por la proporción de la conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán. Así, el aumento o disminución en el número de células viables se puede detectar midiendo la concentración de formazan reflejada en la densidad óptica determinada por absorbancia a $\lambda=590\text{nm}$ ([Van Meerlo, et al, 2011](#)).

2.2.3.2.2 Procedimiento

En una plaza de 96 pozos, se sembraron 9,600 células/pozo en un volumen final de 200 μ L. Cuando los cultivos alcanzaron el 80 % de confluencia, se privaron de suero. A las 17h de privación, se agregaron los tratamientos durante 12, 24, 48 y 72h. Tres horas antes de cumplirse el tiempo de tratamiento, se añadió el 10% del volumen total de reactivo MTT (20 μ L) ([Merck, Alemania](#)), y se incubó durante 3 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Previo a la lectura, se retiró el sobrenadante, y se añadieron 50 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazán y se leyó a una longitud de onda de 590nm en el equipo *Spectra Max Microplate Spectrophotometer* ([Sunyvale, CA, USA](#)).

2.2.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno por el método de diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína

2.2.4.1 Fundamento

El diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), es un ensayo comúnmente utilizado para evaluar la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno. El H_2DCFDA es permeable a la membrana plasmática, por lo que una vez dentro de la célula, éste es desacetilado por las esterasas celulares para formar 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF). En presencia de ROS, el H_2DCF se oxida a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Yang, et al, 2014).

2.2.4.2 Procedimiento

En una plaza de 96 pozos, se sembraron 9,600 células/pozo en un volumen final de 200 μ L. Cuando los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia, se privaron de suero. A las 17h de privación, se agregaron los tratamientos durante 3, 6 y 12h. A los tiempos indicados, se extrajo el medio de cultivo e hizo un lavado con buffer de fosfatos (PBS) (Sigma, USA). Se desechó el sobrenadante y se agregaron 50 μ L de H_2DCFDA 25 μ M en solución de Hanks (Gibco, USA) y se incubó a 37°C durante 30 minutos en la oscuridad. Inmediatamente después de terminar el tiempo indicado, se retiró la solución, se añadieron 50 μ L de PBS por pozo. La intensidad de fluorescencia se analizó a las longitudes de excitación y emisión $\lambda_{ex}= 485$, $\lambda_{emi}=535$ en el espectrofluorómetro Infinite 200 ProTECAN (TECAN, San Jose, CA, USA).

2.2.5 Determinación de anión superóxido mitocondrial por MitoSOX

2.2.5.1 Fundamento

La hidroetidina (MitoSOXTM Red) es un compuesto permeable a células vivas y dirigido específicamente a las mitocondrias. Una vez en la mitocondria, el reactivo MitoSOXTM Red se oxida selectivamente con el anión superóxido y muestra una fluorescencia roja. El producto de oxidación se vuelve altamente fluorescente al unirse a los ácidos nucleicos, emitiendo una longitud de onda máxima de excitación/emisión de $\lambda=510/580$ nm (ThermoFisher, 2005).

2.2.5.2 Procedimiento

En una placa de 96 pozos, se sembraron 9,600 células/pozo en un volumen final de 200 μ L. Cuando los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia, se privaron de suero. A las 17h de privación, se agregaron los tratamientos durante 3, 6 y 12h. A los tiempos indicados, se extrajo el medio de cultivo e hizo un lavado con PBS, se desechó el sobrenadante y se agregaron 50 μ L de MitoSOX™ ([ThermoFisher, USA](#)) 5 μ M en solución de Hanks y se incubó a 37°C durante 30 minutos en la oscuridad. Inmediatamente después de terminar el tiempo indicado, se retiró la solución, se añadieron 50 μ L de PBS por pozo y se leyó la intensidad de fluorescencia $\lambda_{ex}= 485$, $\lambda_{emi}=535$ en el espectrofluorómetro Infinite 200 ProTECAN ([TECAN, San Jose, CA, USA](#)).

2.2.6 Determinación de la secreción de citocinas proinflamatorias por ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

2.2.6.1 Fundamento

Se basa en la interacción natural antígeno anticuerpo. La detección por el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas ([ELISA](#)) en formato de captura de antígeno, requiere de dos anticuerpos, uno de captura y uno de detección, con sitios de reconocimiento sobre el antígeno diferentes para cada uno. La técnica consiste en añadir en una placa, el anticuerpo de captura y fijarlo; posteriormente se añade el antígeno (proteína) de interés. Por último, se añade el anticuerpo de captura acoplado a una enzima que se detecta a partir de un sustrato específico para la enzima, éste genera un producto colorido soluble, el cual se detecta espectrofotométricamente a la longitud de onda específica para cada compuesto (≈ 600 nm) ([Alhajj, Zubair, Farhana A, 2023](#)).

2.2.6.2 Procedimiento

En una placa de 96 pozos, se añadieron 50 μ L a cada pozo de solución de anticuerpo de captura ([R&D systems, USA](#)) y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró la solución y se realizaron tres lavados consecutivos con 300 μ L de buffer de lavado (0.05% Tween 20 en PBS). Se adicionaron 150 μ L de

solución de bloqueo (Sucrosa 5% y Albúmina de suero bovino 1%) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Seguido a esto, se extrajo el contenido de cada pozo, se realizaron tres lavados consecutivos con 300µL de buffer de lavado. De cada condición experimental, se añadieron 50µL de la muestra y se dejaron incubar durante 2 h a 37 °C. Una vez pasado este tiempo, se vaciaron los pozos y se realizaron tres lavados consecutivos con 300µL de buffer de lavado, se añadieron 50µL del anticuerpo de captura ([R&D systems, USA](#)) y se incubó durante 2 h a 37 °C. Terminada la incubación, se realizaron tres lavados con 300µL de buffer de lavado y se añadieron 50µL de Streptavidina (1:3000) conjugada a peroxidasa ([Streptavidina-HRP](#)) ([Invitrogen, USA](#)). Se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el contenido de la placa, se realizaron tres lavados con 300µL de buffer de lavado, se añadieron 50µL de la solución substrato ([TMB](#)) ([Life technologies, USA](#)) y se incubó durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 50µL de solución de paro (Ácido sulfúrico 0.5M) y se realizó la lectura en un lector de placas a 450nm en el equipo *Spectra Max* Microplate Spectrophotometer, ([Sunyvale, CA, USA](#)). Para las condiciones específicas se siguieron las instrucciones del fabricante para IL-6 ([R&D and Preprotech](#)).

2.2.7 Análisis Estadístico

Para cada grupo de tratamiento, se realizaron tres experimentos independientes, por triplicado para cada condición experimental. Los datos obtenidos fueron analizados mediante una prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad. Posteriormente se aplicó un análisis de varianza ([ANOVA](#)) de dos vías. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. El tratamiento de los datos se realizó con el *software* GraphPad Prism v8 ([GraphPad, Boston, MA, USA](#)).

3. RESULTADOS

3.1 Los bisfenoles afectaron diferencialmente la viabilidad celular

De forma general, ninguna de las concentraciones probadas tuvieron un efecto sobre la viabilidad celular. Con respecto a las concentraciones evaluadas de BPAF fueron entre cuatro a veinte veces menores a las probadas en con el BPA, BPS y BPF (Figura 4). Sin embargo, la concentración 3.5 μM de BPAF disminuyó la viabilidad en $\approx 55\%$. En los subsecuentes experimentos, se decidió utilizar las concentraciones más altas, sin efecto citotóxico.

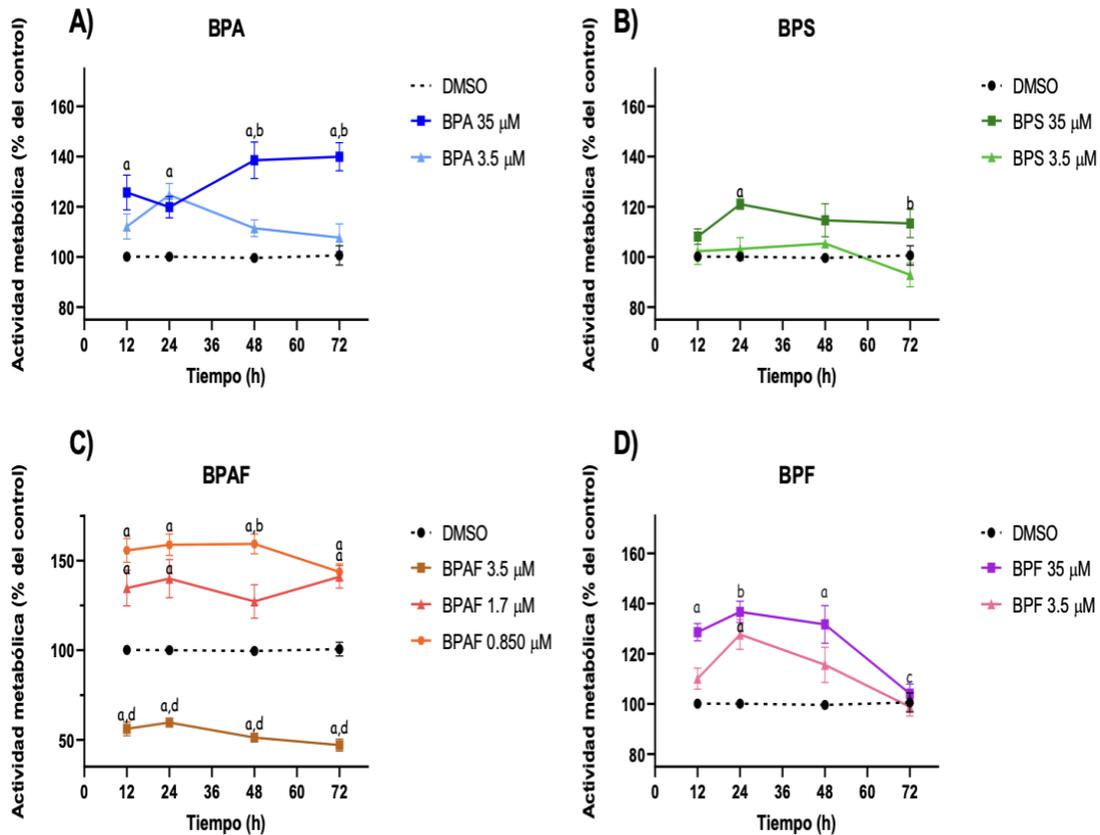


Figura 4. La exposición a los diferentes bisfenoles afectó diferencialmente la viabilidad celular. Las células fueron expuestas durante 12, 24, 48 y 72 h a BPA (A), BPS (B) y BPF (D) 3.5 y 35 μ M y BPAF (C) 3.5, 1.7, 0.850 μ M. Los resultados se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado y se expresan como porcentaje de actividad metabólica con respecto al control. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías; a = $p < 0.05$ respecto al vehículo, b = $p < 0.05$ respecto a la concentración de cada tiempo, c = $p < 0.05$ respecto al valor del tiempo previo de la misma concentración del bisfenol (BP) correspondiente, d = $p < 0.05$ respecto a todas las concentraciones y tiempos del BP correspondiente.

3.2 La exposición a bisfenoles incrementó diferencialmente la producción de ROS celulares

El BPS, indujo un aumento de ROS con respecto al vehículo en las dos concentraciones evaluadas (3.5 y 35 μM). Dicho cambio se produjo a partir de las 3h y se mantuvo hasta las 12 h (Fig. 5b). Para el caso del BPA (Fig. 5a) y BPF, (Fig. 5d), los incrementos de ROS se indujeron a partir de las 3h y se mantuvieron sin cambio hasta las 12h. Por otro lado, ambas concentraciones de BPAF (0.850 y 1.7 μM) indujeron un aumento a las 3h y a las 12h para la concentración 0.850 μM .

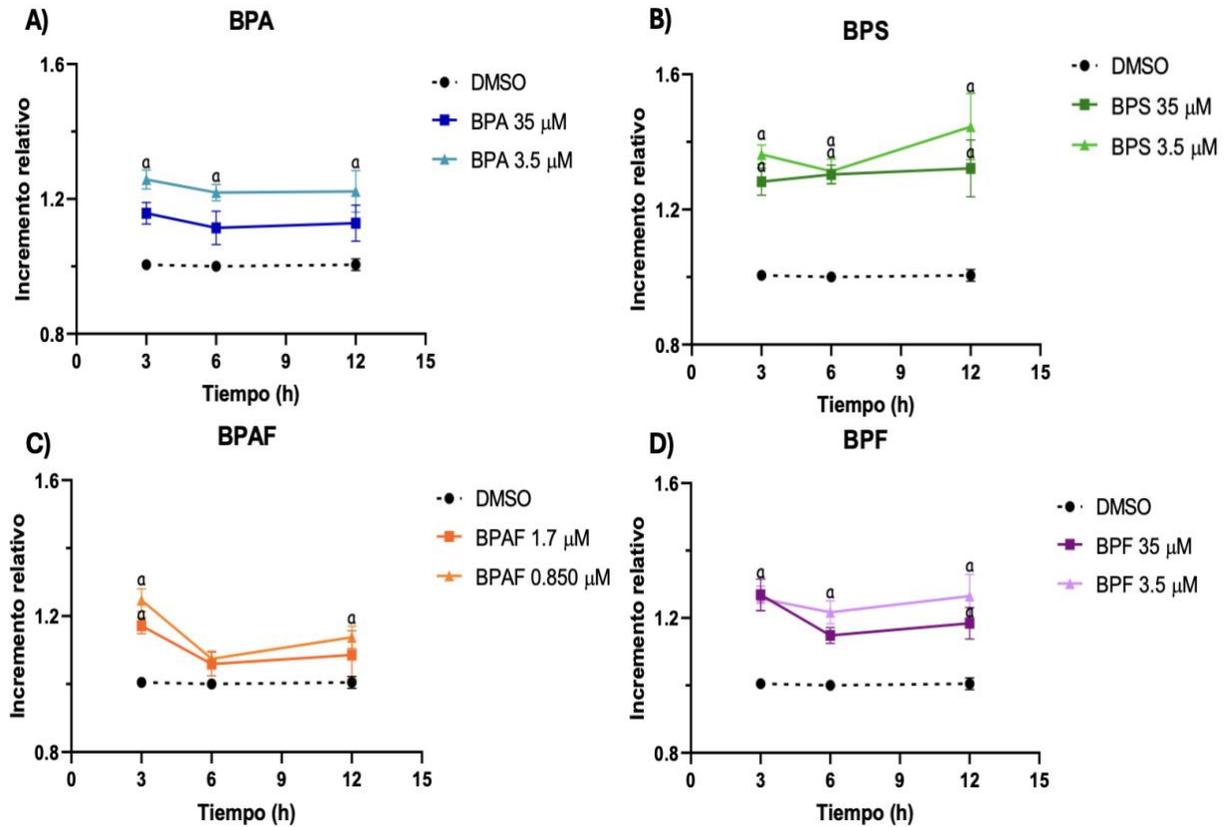


Figura 5. La exposición a BPs incrementó diferencialmente la producción de ROS celulares. Las células fueron expuestas durante 3, 6 y 12 h a BPA (A), BPS (B) y BPF (D) 3.5 y 35 μM o a BPAF (C) 1.7 y 0.850 μM . Los gráficos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías; a = $p < 0.05$ respecto al vehículo.

3.3 La exposición a bisfenoles incrementó diferencialmente la producción de ROS mitocondriales

El BPS (3.5 y 35 μM) indujo un incremento de ROS mitocondrial a las 3 h (Fig. 6b), sin embargo este se mantuvo hasta las 12h sólo en la concentración más baja (3.5 μM). Por otro lado, sólo se reportó inducción por BPA (Fig. 6a) a las 3h para ambas concentraciones. En el caso del BPAF, la concentración de 0.850 μM , indujo un incremento significativo a las 3h (Fig. 6c). Por último, sólo BPF 3.5 μM indujo un aumento persistente de ROS en todos los tiempos (3.12h) (Fig. 6d.)

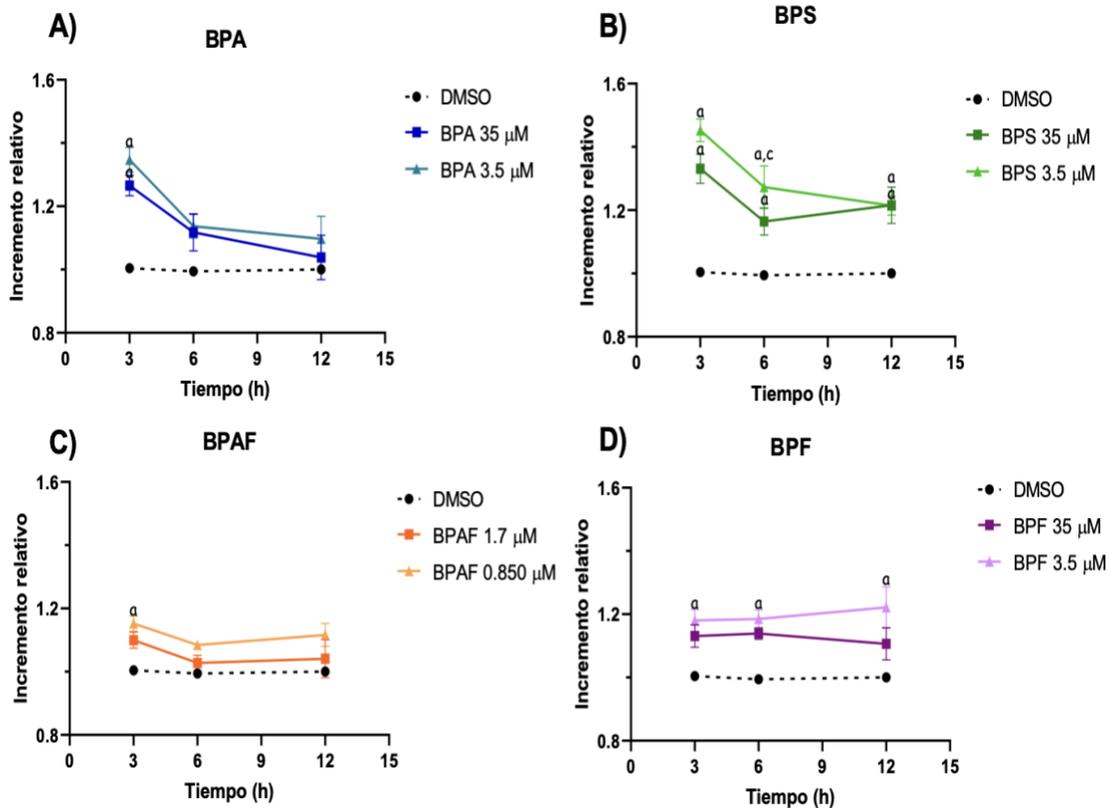


Figura 6. La exposición a BPs incrementó diferencialmente la producción de ROS mitocondriales. Las células fueron expuestas durante 3, 6 y 12 h a BPA (A), BPS (B) y BPF (D) 3.5 y 35 μM o a BPAF (C) 1.7 y 0.850 μM . Las gráficas representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó un análisis de ANOVA de 2 vías; a = $p < 0.05$ respecto al vehículo, c = $p < 0.05$ respecto al valor del tiempo previo de la misma concentración del BP correspondiente.

Para explorar la posible contribución de los ROS mitocondriales a los niveles de los ROS celulares (totales) se calculó la tasa de cambio entre los ROS celulares y los ROS totales (Tabla 4). Los valores de las tasas más cercanos a uno (1.0-1.05), indicaron que niveles de ROS celulares y ROS mitocondriales son muy cercanos, como se observa en los tres tiempos evaluados de 35 μM de BPA, 3.5 μM de BPA a las 3 h y 1.7 μM de BPAF a las 3h. En contraste, cuando los valores de la relación fueron >1.05 , los niveles de ROS celulares superaron los niveles de ROS mitocondrial, como ocurrió con las concentraciones 3.5 y 35 μM de BPS, 0.85 μM de BPAF a las 3, 6 y 12 h, así como con 1.7 μM de BPAF a las 6 y 12 h.

Tabla 4 . Tasa de cambio de ROS celulares / ROS mitocondriales

Tiempo	DMSO	Concentración μM							
		BPA 35	BPA 3.5	BPS 35	BPS 3.5	BPAF 1.7	BPAF 0.85	BPF 35	BPF 3.5
3h	1.000	1.008	1.037	1.064	1.061	1.050	1.082	1.113	1.112
6h	1.006	1.034	1.065	1.111	1.125	1.128	1.115	1.106	1.105
12h	1.005	1.040	1.070	1.072	1.100	1.114	1.122	1.126	1.147

Nota: Los valores **resaltados** representan un origen mitocondrial de ROS.

3.4 La exposición a bisfenoles afectó la secreción de IL-6

Los resultados mostraron que el BPA indujo la secreción de IL-6 de manera dependiente del tiempo y la concentración (Fig. 7a). El BPS, a ambas concentraciones evaluadas, inhibió la secreción de IL-6 con respecto al vehículo, a las 72 h (Fig. 7b). Por lo que respecta al BPAF (1.7 μM), este indujo la secreción de la IL-6 a partir de las 24 h de exposición y se mantuvo hasta las 72 h (Fig. 7c). De la misma manera, BPF (3.5 μM) indujo la secreción de IL-6 hasta las 72 h de exposición (Fig. 7d). Los niveles máximos de secreción de IL-6 fueron los inducidos por BPA, los cuales corresponden ≈ 2.5 veces más que la inducidas por el BPAF y el BPF.

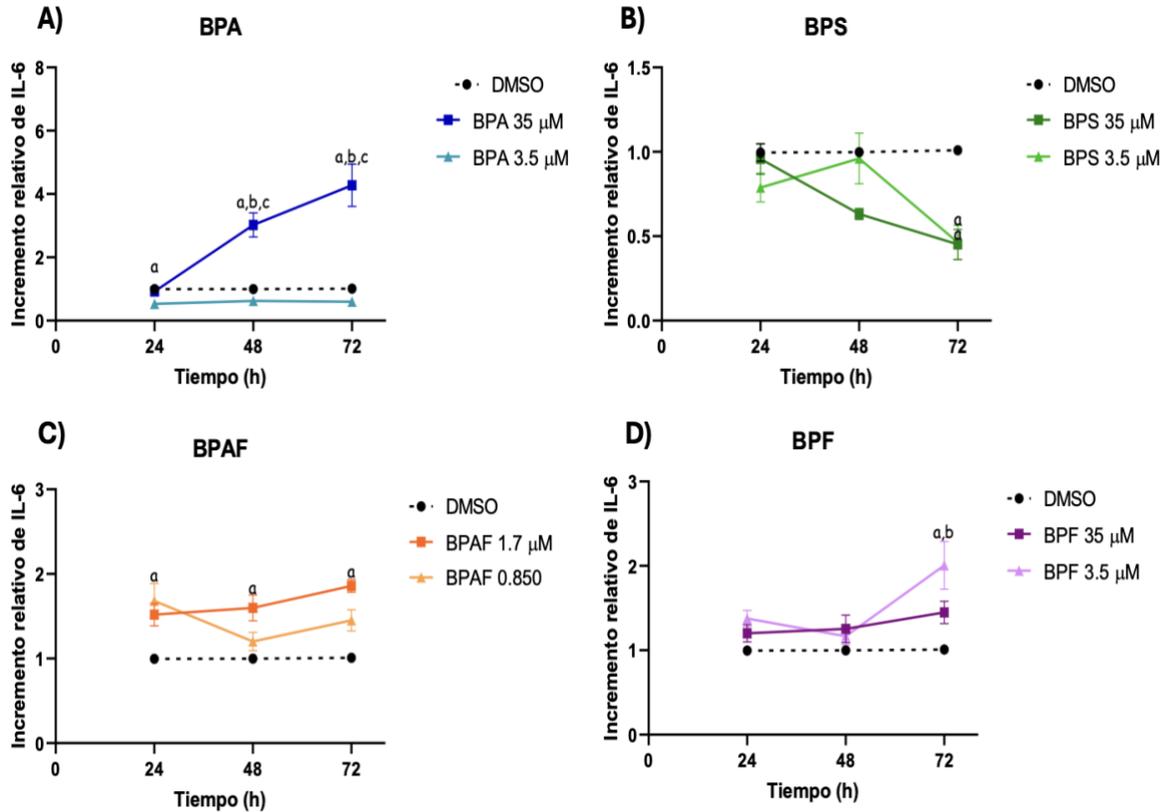


Figura 7. **La exposición a BPs afectó la secreción de IL-6.** Las células fueron expuestas durante 24, 48 y 72h a 3.5 y 35 μ M de BPA (A), BPS (B) y BPF (D) y a 0.850 y 1.7 μ M de BPAF (C). Los resultados representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Se realizó un análisis de ANOVA de 2 vías; a = $p < 0.05$ respecto al vehículo, b = $p < 0.05$ respecto a la concentración de cada tiempo, c = $p < 0.05$ respecto a los tiempos de la misma concentración de cada BPs. NOTA: las escalas de las gráficas son diferentes.

4 DISCUSIÓN

La disfunción endotelial es el proceso que precede a la formación de la placa aterosclerótica, la cual conlleva a un estado protorombótico y a la inflamación crónica de los vasos sanguíneos (Tibaut, et al, 2019). En los últimos años, debido a su capacidad de inducir inflamación y la producción de especies reactivas de oxígeno, la exposición a BPA se ha asociado con el riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (Nayak, et al, 2022). Como consecuencia de ello, en un plan para sustituir al BPA, se han introducido bisfenoles análogos estructurales del BPA con características químicas similares, denominados BNGs, siendo los más utilizados el BPS, BPAF y BPF. Sin embargo, a la fecha no existe evidencia suficiente que respalden el uso seguro de los mismos, ni si la exposición a estos podría contribuir al riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. En el presente proyecto fueron evaluadas dos concentraciones distintas de BPA y de BNGs en un modelo *in vitro* para analizar su capacidad de activar el endotelio hacia un fenotipo inflamatorio.

Exposición a bisfenoles y la viabilidad celular

Las exposiciones a los diferentes bisfenoles no afectaron la viabilidad celular. Lo anterior concuerda con estudios previos que demuestran que concentraciones de BPA, BPS y BPF, inclusive mayores que las que evaluamos en nuestro estudio, no afectaron significativamente la viabilidad de las células endoteliales humanas (Guixiang, et al, 2022). De manera contrastante, el BPAF 3.5 μM disminuyó la actividad metabólica en un 50% con respecto al vehículo. En este sentido, estos resultados fueron contradictorios a los reportados por otros grupos de investigación, pero en otras estirpes celulares, lo que sugiere que la toxicidad del BPAF es dependiendo del tipo de cultivo y tipo de células. En un estudio realizado por Sendra y col. (2023), el BPAF a las concentraciones de 80 y 160 μM (22 y 45 veces mayores a las utilizadas en el presente trabajo), el BPAF no afectó la viabilidad en hepatocitos de la línea celular HEPG2 expuestos durante 24 y 96 h. No obstante, Mlynarcikova & Scsukova reportaron que 100 μM de BPAF disminuyó en un 80% la viabilidad de

las células de la granulosa COV434 expuestas durante 24h ([Mlynarcikova & Scsukova, 2021](#)). De la misma manera Harnett y col., reportaron que después de la exposición por 20 minutos a BPAF, en un cultivo primario de adipocitos humanos, una concentración letal 50 (CL_{50}) = 0.0049 μ M ([Harnett, et al, 2021](#)). Lo anterior pudiese tener relación con algunas diferencias en la toxicocinética del BPAF, con relación a la del BPA tanto en modelos animales como en estudios en humanos. Al igual que el BPA, son metabolizados por reacciones de fase II a través de las enzimas UGT y SULT. Sin embargo, para el metabolismo de BPA las isoformas principales encargadas de UGT son la UGT2B15 y 2B7 mientras que para BPAF es la isoforma 2B4 expresadas mayoritariamente en el hígado, vesícula biliar, duodeno, páncreas, endometrio y riñón ([Ouzzine, et al, 2014](#); [Ziegler, et al, 2015](#); [Bgee, 2024](#)). Asimismo, las principales isoformas de la enzima SULT que forman sulfatos de bisfenoles son la SULT1A1, 2A1 y 1E1, las cuales poseen mayor presencia en hígado, colon, tiroides, páncreas, monocitos, pulmones y riñones ([Uniprot, 2024](#); [Bgee, 2024](#)). En este sentido, la poca o nula expresión de estas enzimas en células como los adipocitos, células endoteliales y células de la granulosa, imposibilitaría el metabolismo del BPAF en nuestro modelo celular, incrementando su toxicidad.

Efecto de la exposición a bisfenoles sobre la actividad endotelial

La activación del endotelio se evaluó a través de la capacidad de los BPs para generar un ambiente oxidante mediante la producción de ROS así como la inducción de mecanismos proinflamatorios, medido a través de la secreción de IL-6.

La exposición a los bisfenoles evaluados en el presente trabajo (BPA, BPS, BPAF y BPF) indujo diferencialmente cambios en la producción de ROS, siendo significativamente mayor el efecto a la menor concentración probada. Establecimos que el origen de los ROS, de acuerdo a la tasa de cambio realizada, fue mitocondrial. La producción de ROS mitocondriales podrían ser resultado de la generación del radical superóxido (O_2^-) por parte la cadena respiratoria mitocondrial ([Burtenshaw, et al, 2017](#)). Las ROS se generan por diferentes mecanismos, que

incluye la producción que resulta de reacciones enzimáticas en la cadena respiratoria en la mitocondria ([Burtenshaw, et al, 2017](#)). Los valores de las tasas de las ROS celulares/ROS mitocondriales sugiere que una alta proporción de las ROS celulares proviene de la activación metabólica de la célula ([Tirichen, et al, 2021](#)). Estos datos coinciden con lo observado en los ensayos de viabilidad, donde se reportó un aumento de la actividad metabólica mitocondrial. Para BPS, BPF y BPAF, los resultados sugieren que, además del origen mitocondrial, la producción de ROS tiene otras fuentes intracelulares. Una de estas fuentes es la activación de las enzimas NADPH oxidasas (NOX) encargadas principalmente de la producción del anión superóxido, que además de encontrarse en la mitocondria, se expresan en la membrana celular, retículo endoplásmico, y/o membrana nuclear ([Burtenshaw, et al, 2017](#)).

Independientemente del origen de las ROS inducidas por los BPs evaluados, estos generarían un ambiente oxidante, el cual es un factor clave para la disfunción endotelial. Nuestros resultados coinciden con los de estudios previos, donde también se ha reportado la inducción de ROS asociada a la exposición a bisfenoles. Easson y col. demostraron que en células endoteliales HUVEC, la exposición a 25µM de BPS indujo un aumento de ROS celulares y mitocondriales, una disminución de la producción de óxido nítrico, así como una disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes como SOD y Catalasa ([CAT](#)). Por otro lado, en larvas de pez cebra, se ha demostrado que la exposición a BPA, BPS, BPAF y BPF induce la generación de ROS, así como la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT ([Guixiang Ji, et al, 2022](#)). Considerando lo antes mencionado, un aspecto que debe considerarse cuando incrementan los niveles de ROS, es la funcionalidad del sistema antioxidante. En nuestro trabajo no evaluamos si la exposición a BPA, BPS, BPAF o BPF altera el sistema antióxidante de nuestro modelo celular, por lo que se requieren de futuros estudios para establecerlo.

Es importante mencionar que hoy en día, las ROS son consideradas como indicadores de daño o muerte celular, pero también tienen actividades funcionales que incluyen la activación de diferentes vías de señalización intracelular como la

proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), MAPK y NFκB (Lingappan, 2018; Burtenshaw, et al, 2017). En este sentido, la inducción de ROS por los bisfenoles, tiene el potencial de activar a NFκB de las células endoteliales y contribuir en la producción de citocinas inflamatorias, de acuerdo a lo previamente propuesto (Didion, 2017).

Activación endotelial y la secreción de Interleucina 6

La inducción de estrés oxidante está relacionada con la activación del endotelio hacia un fenotipo inflamatorio, a través de sus dos vías, la activación endotelial Tipo I y Tipo II, las cuales junto con la producción de citocinas proinflamatorias, dan lugar al inicio de la respuesta inmune (Pons, et al, 2020). En la activación endotelial tipo I, la proteína Rho es activada y junto con la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) , son responsables de controlar la contractilidad del citoesqueleto, abriendo las uniones del endotelio vascular y permitiendo la salida de los cuerpos Weibel-Palade. Esta vía permite la proyección de P-selectina a la membrana luminal, lo que promueve el reclutamiento leucocitario. Este tipo de activación se basa esencialmente en la activación de GPR, los que activan posteriormente a la fosfolipasa C β (PLC-β), promoviendo la liberación de calcio intracelular (Ca²⁺) (Wu, Liu & Zhu, 2017).

En el caso de la activación endotelial tipo II, esta se encuentra mediada por de tres vías asociadas a la activación de : MAP3K, MAPK y/o NFκB. La unión del TNF-α a su receptor (TNFR) promueve el reclutamiento de la proteína del dominio de la muerte asociada a TNFR (TRADD), la proteína 1 de interacción con el receptor (RIP) y del factor 2 asociado al TNFR (TRAF2). Este complejo activa la señalización de la vía de NF-κB y MAP3K/JNK, promoviendo la transcripción de citocinas proinflamatorias a través de NF-κB y la proteína activadora 1 (AP-1). Por otra parte, la IL-1β se une a su receptor membranal IL-1R1, promoviendo el reclutamiento de la proteína accesoria de IL-1R (IL-1RAcP). Esta proteína induce la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos MAPK que activan a JNK, p38 y ERK1/2, y

río abajo, a proteínas como c-Jun, (una subunidad de AP-1). El factor del complemento C3a, pueden activar a JNK, p38 y ERK1/2 e inducir la activación del factor de transcripción NF- κ B (Wu, Liu & Zhu, 2017). De la mano de lo anterior, se ha determinado que los niveles plasmáticos de bisfenoles correlacionan positivamente con disfunción endotelial, favoreciendo la formación de la placa aterosclerótica en poblaciones jóvenes y de adultos mayores (Lind & Lind, 2011; Chu, et al, 2021). Asimismo, en estudios previos se ha relacionado a los bisfenoles con la activación del endotelio a partir de la secreción de citocinas proinflamatorias (Quagliariello, et al 2019; Zhao, et al, 2017; Liu, et al, 2014). Dentro de las citocinas proinflamatorias que se secretan en respuesta a la activación endotelial, se encuentra la IL-6. Esta es una citocina que posee propiedades pro y anti-inflamatorias y es reconocida como mediador primario en respuestas inflamatorias agudas (Didion, 2017). La secreción de IL-6 se ha relacionado positivamente con la progresión de la aterosclerosis. En pacientes post-infarto se ha comprobado que una secreción elevada de IL-6 a las 24 h después del evento, está asociada con un aumento del tamaño del infarto, así como con una disminución en la función cardíaca (Feng, et al, 2022). La transcripción y secreción de esta citocina está mediada por distintos estímulos como la angiotensina II, factores de crecimiento, otras citocinas proinflamatorias y un aumento intracelular de ROS (Didion, 2017). Nuestros resultados demostraron un aumento en la secreción de IL-6 por exposición a los bisfenoles; el BPA fue el que indujo una secreción evidentemente mayor a los demás bisfenoles (BPA>BPAF<BPF), mientras que BPS disminuyó la secreción de la citocina. Con respecto al mecanismo de inducción de IL-6, se ha reportado que, en células de neuroblastoma SH-SY5Y, la exposición a 10 nM de BPA induce la expresión de IL-6 y, un aumento en la expresión de la subunidad de NF- κ B p65 desde los 5 minutos post-exposición (Xiong, et al, 2017). Zhu y col. demostraron que en células de microglia BV2, la exposición a 1 y 100 nM de BPA incrementa la secreción de IL-6 y la fosforilación de JNK 10 min post-exposición y de NF κ B después de los 30 min de exposición (Zhu, et al, 2014). Con base a lo anterior, consideramos que en nuestro modelo, la inducción de la secreción de IL-6 pudiera ser resultado de la activación de la vía de NF κ B. No obstante, se requiere evaluar

en el futuro si la producción de IL-6 en nuestro modelo depende de NFκB y que otras moléculas son afectadas río arriba a este factor de transcripción.

En contraste con el efecto de los otros bisfenoles, el BPS inhibió la secreción de IL-6. Aunque el mecanismo por el cual actúa BPS no ha sido establecido, la literatura reporta que este evento inhibitorio puede estar relacionado con bloqueo en algún punto en la vía de señalización asociada a la activación de NFκB, como los receptores TLR. La inhibición selectiva de TLR ha demostrado previamente inducir la disrupción de la respuesta inmune, inhibiendo la secreción de citocinas proinflamatorias (Gao, et al, 2017). Asimismo, otra posible explicación de este efecto inhibitorio pudiera estar asociado con la inhibición directa a NFκB por el BPS. Un posible blanco podría ser la activación de la vía del Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6) dependiente de sequestosoma 1 (SQSTM1), que favorece la degradación de TRAF6, impidiendo la activación correspondiente de NFκB y por consiguiente, la inhibición de la transcripción y secreción de IL-6 (Deng, et al, 2022). Sin embargo, se requieren estudios futuros para establecer el(los) mecanismo(s) involucrado(s) tanto en el incremento como la inhibición de IL-6, por el BPA, BPAF y BPF, o BPS, respectivamente.

Consideraciones finales

Los hallazgos de este trabajo son importantes desde el punto de vista del estudio de los factores de riesgo para el desarrollo de ECVs. Los BPs se usan abundantemente en prácticamente todo el mundo, por lo cual encuentran ubicuamente distribuidos en el ambiente y por lo tanto la población humana está expuesta continuamente a estos compuestos. Si bien se ha reportado que la exposición a bisfenoles no parece inducir un efecto agudo de gran magnitud, la formación de la placa aterosclerótica ocurre como consecuencia de la presencia crónica de estrés oxidante y un proceso de inflamación crónica de baja intensidad, lo cual se ha asociado al menos a la exposición de BPA. Aunque, existen diversos factores del individuo y factores genéticos que contribuyen al desarrollo de ECVs, la exposición a factores ambientales, como los bisfenoles, es crucial para el desarrollo de estas patologías.

Nuestros resultados sugieren que el BPS, BPAF y BPF (como lo hace también el BPA) inducen diferencialmente dos marcadores, la producción de estrés oxidante y de una respuesta inflamatoria, críticos para la inducción de disfunción endotelial, un proceso que se ha establecido juegan un papel importante en las ECVs. Si bien se requieren más estudios para sustentarlo, nuestros datos sugieren que los BNGs no son inocuos, al menos desde el punto de vista de sus efectos a nivel endotelial *in vitro*. La tendencia actual está dirigida a substituir el BPA en los productos plásticos por los BNGs, los cuales se utilizan en mezclas de proporciones desconocidas, por lo que sus efectos potencialmente tóxicos, y probablemente mayor a la de los compuestos individuales, se desconocen a nivel endotelial. Por lo anterior, con base en los resultados del presente estudio, consideramos deben ser evaluados los efectos toxicológicos de las mezclas de BNGs y con ello contribuir a la regulación de su uso en productos de consumo en humanos.

Aunque existieron limitantes en el presente trabajo como el número de parámetros evaluados, así como las concentraciones evaluadas, este representa el primer acercamiento para establecer los posibles efectos de la exposición a los BNGs en células endoteliales humanas y su relación con la inducción de disfunción endotelial. Para estudios futuros deberán evaluarse los niveles de ROS a tiempos cortos de exposición a los BNGs, determinar el efecto sobre el sistema antioxidante de las células, así como otros marcadores de activación endotelial, como son la producción de NO, expresión de iNOS, función del sistema antioxidante, producción de otras citocinas inflamatorias, expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, entre otros.

5. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la exposición a BPA, BPS, BPAF y BPF afecta diferencialmente a las células EA. hy926.

1. El BPAF demostró ser citotóxico a las concentraciones que no lo hicieron el BPA, BPS y BPS.
2. El BPS induce una mayor producción de ROS comparado con BPA>BPAF>BPF, pero no indujo IL-6.
3. El BPA> BPAF> BPF indujeron tanto ROS como IL-6.
4. Los resultados obtenidos mostraron que los BNG afectan en mayor o menor magnitud los parámetros analizados con respecto al BPA.
5. Estos datos sugieren que los BNGs no representan una opción segura como alternativa al BPA.

En conclusión, nuestros datos sugieren que los BNGs tienen el potencial de inducir disfunción endotelial, por lo que podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se requiere de más estudios para definir cuál es su papel en la disfunción endotelial.

6. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto de la exposición de BPA, BPS, BPAF y BPF sobre los niveles de expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico dependiente de esta.
2. Estudiar el efecto de la exposición a BPA, BPS, BPAF y BPF sobre la expresión y actividad de las enzimas del sistema antioxidante de las células, así como la determinación de estrés oxidante a través de malondialdehído.
3. Estudiar el efecto de la exposición a BPA, BPS, BPAF y BPF sobre otros marcadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β y anti-inflamatorios como IL-10, así como a través de la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria como I-CAM, V-CAM y P-selectina.

4. Evaluar los parámetros determinados en este proyecto, así como los antes mencionados en diferentes proporciones de mezclas de BPA, BPS, BPAF y BPF.

7. REFERENCIAS

Aboul Ezz, H. S., Khadrawy, Y. A., & Mourad, I. M. (2015). The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology*, 67(1), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9672-1>

Adu-Gyamfi, E. A., Rosenfeld, C. S., & Tuteja, G. (2022). The impact of bisphenol A on the placenta†. *Biology of reproduction*, 106(5), 826–834. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac001>

Alhajj M, Zubair M, Farhana A. (2023) Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>

Allard, P. & Colaiácovo, M. (2011) Chapter 50 - Bisphenol A, Editor(s): Ramesh C. Gupta, Reproductive and Developmental Toxicology, Academic Press, 2011, Pages 673-686, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10050-5>.

Anand S, Hawkes C, de Souza R, et al. (2015) Food Consumption and its Impact on Cardiovascular Disease: Importance of Solutions Focused on the Globalized Food System. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Oct, 66 (14) 1590–1614. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.07.050>

Andersson, H., & Brittebo, E. (2012). Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. *Archives of toxicology*, 86(3), 465–474. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0766-2>

Bao, W., Liu, B., Rong, S., Dai, S. Y., Trasande, L., & Lehmler, H. J. (2020). Association Between Bisphenol A Exposure and Risk of All-Cause and Cause-Specific Mortality in US Adults. *JAMA network open*, 3(8), e2011620. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.11620>

Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>

Bgee (2024) Gene: UGT2B15, Homo Sapiens, retrieved from: <https://www.bgee.org/gene/ENSG00000196620>

Bgee (2024) Gene: UGT2B7, Homo Sapiens, retrieved from: <https://www.bgee.org/gene/ENSG00000196620>

Bgee (2024) Gene: UGT2B4, Homo Sapiens, retrieved from: <https://www.bgee.org/gene/ENSG00000156096>

Bonacina, F., & Norata, G. (2023) Vinculin phosphorylation modulates endothelial cell permeability: a new target for cardiovascular disease? *European Heart Journal*, vol 44 44, 319–321 <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac704>

Bonafiglia, Q., Bendeck, M., Gotlieb, A., (2022) Chapter 7 - Vascular Pathobiology: Atherosclerosis and Large Vessel Disease, *Cardiovascular Pathology*, Fifth edition, pages, 265-306, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822224-9.00006-2>.

Boot, E., Sane, M., Putaala, J., Kittner, S., De Leeuw, FE., Tuladhar, A. (2020), Ischaemic stroke in young adults: a global perspective, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020;91:411-417.

Bots, S. H., Peters, S. A. E., & Woodward, M. (2017). Sex differences in coronary heart disease and stroke mortality: a global assessment of the effect of ageing between 1980 and 2010. *BMJ global health*, 2(2), e000298. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000298>

Brown, J., Gerhardt, T., Kwon E. (2023) Risk Factors for Coronary Artery Disease. [Updated 2023 Jan 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554410/>

Burtenshaw, D., Hakimjavadi, R., Redmond, E. M., & Cahill, P. A. (2017). Nox, Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 6(4), 90. <https://doi.org/10.3390/antiox6040090>

Cai, S., Rao, X., Ye, J., Ling, Y., Mi, S., Chen, H., Fan, C., & Li, Y. (2020). Relationship between urinary bisphenol a levels and cardiovascular diseases in the U.S. adult population, 2003-2014. *Ecotoxicology and environmental safety*, 192, 110300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110300>

Canas, J., Sweeten, S., Prabhakaran, B. (2013) Biomarkers for cardiovascular risk in children, *Current Opinion in Cardiology* 28(2): p 103-114, DOI: 10.1097/HCO.0b013e32835dd0ce

Cayman Chemicals (2016) WST-8 Cell proliferation assay kit, item No. 10010199, <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/10010199.pdf>

CDC (2015) Smoking and Cardiovascular Disease, Office on Smoking and health, https://www.cdc.gov/tobacco/sgr/50th-anniversary/pdfs/fs_smoking_cvd_508.pdf

CDC (2017) BISPHEENOL A, biomonitoring summary, CAS No. 80-05-7, <https://shorturl.at/dexyl>

CDC (2023) Know Your Risk for Heart Disease, Heart Disease, <https://shorturl.at/mpKPW>

Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U., & Boonyuen, U. (2019). Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC biochemistry*, 20(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12858-019-0108-1>

Chareonrungrueangchai, K., Wongkawinwoot, K., Anothaisintawee, T., & Reutrakul, S. (2020). Dietary Factors and Risks of Cardiovascular Diseases: An Umbrella Review. *Nutrients*, 12(4), 1088. <https://doi.org/10.3390/nu12041088>

ChemAnalyst (2021) Bisphenol S: Market Analysis, Decode the future of BPS, <https://www.chemanalyst.com/industry-report/bisphenol-s-290>

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environmental science & technology*, 50(11), 5438–5453. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>

Chen, Q., Lv, J., Yang, W., Xu, B., Wang, Z., Yu, Z., Wu, J., Yang, Y., & Han, Y. (2019). Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis. *Theranostics*, 9(22), 6424–6442. <https://doi.org/10.7150/thno.35528>

Chen, Q., Wang, Q., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2018). Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *British journal of pharmacology*, 175(8), 1279–1292. <https://doi.org/10.1111/bph.13828>

Cho, Y. J., Park, S. B., Park, J. W., Oh, S. R., & Han, M. (2018). Bisphenol A modulates inflammation and proliferation pathway in human endometrial stromal cells by inducing oxidative stress. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *81*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.016>

Chowdhury, R., Ramond, A., O'Keeffe, L. M., Shahzad, S., Kunutsor, S. K., Muka, T., Gregson, J., Willeit, P., Warnakula, S., Khan, H., Chowdhury, S., Gobin, R., Franco, O. H., & Di Angelantonio, E. (2018). Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, *362*, k3310. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3310>

Chu, P. L., Lin, C. Y., Sung, F. C., & Su, T. C. (2021). Apoptotic microparticles mediate the association between bisphenol A and subclinical atherosclerosis in a young population: A population-based study. *Ecotoxicology and environmental safety*, *224*, 112663. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112663>

Colman R. W. (2006). Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *The Journal of experimental medicine*, *203*(3), 493–495. <https://doi.org/10.1084/jem.20060217>

Cusabio (2024) Cytokine Inhibitor, Cytokines information, available at: <https://shorturl.at/2mYg8>

Darbre P. (2018). Overview of air pollution and endocrine disorders. *International journal of general medicine*, *11*, 191–207. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S102230>

Darbre, P. (2019) The history of endocrine-disrupting chemicals, Current opinion in endocrine and metabolic research, Volume 7, pages 26-33, <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.007>

Deng, T., Hu, B., Wang, X., Ding, S., Lin, L., Yan, Y., Peng, X., Zheng, X., Liao, M., Jin, Y., Dong, W., Gu, J., & Zhou, J. (2022). TRAF6 autophagic degradation by *avibirnavirus* VP3 inhibits antiviral innate immunity via blocking NFKB/NF-κB activation. *Autophagy*, *18*(12), 2781–2798. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2047384>

Dias, P., Tvrđý, V., Jirkovský, E., Dolenc, M. S., Peterlin Mašič, L., & Mladěnka, P. (2022). The effects of bisphenols on the cardiovascular system. *Critical reviews in toxicology*, *52*(1), 66–87. <https://doi.org/10.1080/10408444.2022.2046690>

Didion, S. (2017). "Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature" *International Journal of Molecular Sciences* *18*, no. 12: 2563. <https://doi.org/10.3390/ijms18122563>

Ding, C., O'Neill, D., Bell, S., Stamatakis, E., & Britton, A. (2021). Association of alcohol consumption with morbidity and mortality in patients with cardiovascular disease: original data and meta-analysis of 48,423 men and women. *BMC medicine*, 19(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02040-2>.

ECHA (2023) Bisphenol AF, Substance infocard, <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.014.579>

EFSA (2008) Toxicokinetics of Bisphenol A, Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC), (Question No EFSA-Q-2008-382), <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2008.759>

Fang, C., Ning, B., Waqar, A. B., Niimi, M., Li, S., Satoh, K., Shiomi, M., Ye, T., Dong, S., & Fan, J. (2015). Bisphenol A exposure induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits. *Journal of applied toxicology: JAT*, 35(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1002/jat.3103>

Farhat, Y. "ELISA Protocol for R&D Systems DuoSetKit." Protocol Place. July 2012. Accessed on mm/dd/yyyy. </>

Feng, Y., Ye, D., Wang, Z., Pan, H., Lu, X., Wang, M., Xu, Y., Yu, J., Zhang, J., Zhao, M., Xu, S., Pan, W., Yin, Z., Ye, J., & Wan, J. (2022). The Role of Interleukin-6 Family Members in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 9, 818890. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.818890>

Foster, W. G., Kubwabo, C., Kosarac, I., Gregorovich, S., Aryal, G., & Coleman, K. (2019). Free bisphenol A (BPA), BPA-Glucuronide (BPA-G), and total BPA concentrations in maternal serum and urine during pregnancy and umbilical cord blood at delivery. *Emerging Contaminants*, 5, 279–287. [doi:10.1016/j.emcon.2019.08.00](https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.08.00)

Frankowski, Robert & Zgoła-Grześkowiak, Agnieszka & Smulek, Wojciech & Grześkowiak, Tomasz. (2020). Removal of Bisphenol A and Its Potential Substitutes by Biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 191. [10.1007/s12010-020-03247-4](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03247-4).

Fu, X., Xu, J., Zhang, R., & Yu, J. (2020). The association between environmental endocrine disruptors and cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis. *Environmental research*, 187, 109464. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109464>

Gao, Q., Niu, Y., Wang, B., Liu, J., Zhao, Y., Zhang, J., ... Shao, B. (2021). *Estimation of lactating mothers' daily intakes of bisphenol A using breast milk. Environmental Pollution, 286, 117545*.doi:10.1016/j.envpol.2021.1175

Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in physiology, 8*, 508. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>

Gao, Z., Chen, Z., Sun, A., Deng, X., (2019) Gender differences in cardiovascular disease, *Medicine in Novel Technology and Devices, Volume 4, 100025, ISSN 2590-0935, https://doi.org/10.1016/j.medntd.2019.100025.*

Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Gély, C. A., Grandin, F. C., Léandri, R., Bouchard, M., Roques, B., Toutain, P. L., & Picard-Hagen, N. (2020). Toxicokinetics of bisphenol S in rats for predicting human bisphenol S clearance from allometric scaling. *Toxicology and applied pharmacology, 386, 114845*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114845>

Gielis, J. F., Quirynen, L., Briedé, J. J., Roelant, E., Cos, P., & Van Schil, P. E. Y. (2017). Pathogenetic role of endothelial nitric oxide synthase uncoupling during lung ischaemia-reperfusion injury. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 52*(2), 256–263. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezx125>

Gingrich, J., Pu, Y., Ehrhardt, R., Karthikraj, R., Kannan, K., & Veiga-Lopez, A. (2019). Toxicokinetics of bisphenol A, bisphenol S, and bisphenol F in a pregnancy sheep model. *Chemosphere, 220, 185–194*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.109>

Gonkowski, S., & Makowska, K. (2022). Environmental Pollution with Bisphenol A and Phthalates-A Serious Risk to Human and Animal Health. *International journal of environmental research and public health, 19*(21), 13983. <https://doi.org/10.3390/ijerph192113983>

González, L., Rivera, K., Andia, M. E., & Martínez Rodríguez, G. (2022). The IL-1 Family and Its Role in Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences, 24*(1), 17. <https://doi.org/10.3390/ijms24010017>

Gui, Y., Zheng, H., & Cao, R. Y. (2022). Foam Cells in Atherosclerosis: Novel Insights Into Its Origins, Consequences, and Molecular Mechanisms. *Frontiers in cardiovascular medicine, 9, 845942*. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.845942>

Harnett, K. G., Chin, A., & Schuh, S. M. (2021). BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotoxicology and environmental safety*, 216, 112210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112210>

Hartmann, A., Kieu, E., Fred, Farris, F., (2022) *Obesogens*, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00130-5>.

Heimlich, J. B., & Bick, A. G. (2022). Somatic Mutations in Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 130(1), 149–161. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319809>

Henein, M. Y., Vancheri, S., Longo, G., & Vancheri, F. (2022). The Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 12906. <https://doi.org/10.3390/ijms232112906>

Higashi, Y. (2022). Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Vascular Endothelial Dysfunction-Related Disease. *Antioxidants*, 11(10), 1958. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11101958>

Hollist, M., Au, K., Morgan, L., Shetty, P. A., Rane, R., Hollist, A., Amaniampong, A., & Kirmani, B. F. (2021). Pediatric Stroke: Overview and Recent Updates. *Aging and disease*, 12(4), 1043–1055. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0219>

Homma, S., Troxclair, D. A., Zieske, A. W., Malcom, G. T., Strong, J. P., & Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Research Group (2011). Histological changes and risk factor associations in type 2 atherosclerotic lesions (fatty streaks) in young adults. *Atherosclerosis*, 219(1), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.022>

Hong Y. M. (2010). Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean circulation journal*, 40(1), 1–9. <https://doi.org/10.4070/kcj.2010.40.1.1>

Hu, C., Schöttker, B., Venisse, N., Limousi, F., Saulnier, P. J., Albouy-Llaty, M., Dupuis, A., Brenner, H., Migeot, V., & Hadjadj, S. (2019). Bisphenol A, Chlorinated Derivatives of Bisphenol A and Occurrence of Myocardial Infarction in Patients with Type 2 Diabetes: Nested Case-Control Studies in Two European Cohorts. *Environmental science & technology*, 53(16), 9876–9883. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02963>

Huang, R. P., Liu, Z. H., Yuan, S. F., Yin, H., Dang, Z., & Wu, P. X. (2017). Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000-2016) and its

risk analysis. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 230, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.026>

Immanuel, J., & Yun, S. (2023). Vascular Inflammatory Diseases and Endothelial Phenotypes. *Cells*, 12(12), 1640. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cells12121640>
INEGI (2023) Estadística de defunciones registradas de Enero a junio de 2022 (preliminar), comunicado de prensa # 29/23, <https://shorturl.at/aceX1>

Ji, G., Gu, J., Guo, M., Zhou, L., Wang, Z., Shi, L., & Gu, A. (2022). A systematic comparison of the developmental vascular toxicity of bisphenol A and its alternatives in vivo and in vitro. *Chemosphere*, 291(Pt 2), 132936. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132936>

Kaneko, H., Yano, Y., Okada, A., Itoh, H., Suzuki, Y., Yokota, I., Morita, K., Fujiu, K., Michihata, N., Jo, T., Yamaguchi, S., Takeda, N., Morita, H., Node, K., Yamauchi, T., Nangaku, M., Kadowaki, T., McEvoy, J. W., Lam, C. S. P., Yasunaga, H., ... Komuro, I. (2023). Age-Dependent Association Between Modifiable Risk Factors and Incident Cardiovascular Disease. *Journal of the American Heart Association*, 12(2), e027684. <https://doi.org/10.1161/JAHA.122.027684>

Karmakar, P. C., Ahn, J. S., Kim, Y. H., Jung, S. E., Kim, B. J., Lee, H. S., Kim, S. U., Rahman, M. S., Pang, M. G., & Ryu, B. Y. (2020). Paternal Exposure to Bisphenol-A Transgenerationally Impairs Testis Morphology, Germ Cell Associations, and Stemness Properties of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5408. <https://doi.org/10.3390/ijms21155408>

Khalili Sadrabad, E., Hashemi, S. A., Nadjarzadeh, A., Askari, E., Akrami Mohajeri, F., & Ramroudi, F. (2023). Bisphenol A release from food and beverage containers - A review. *Food science & nutrition*, 11(7), 3718–3728. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3398>

Khmiri, I., Côté, J., Mantha, M., Khemiri, R., Lacroix, M., Gely, C., Toutain, P. L., Picard-Hagen, N., Gayrard, V., & Bouchard, M. (2020). Toxicokinetics of bisphenol-S and its glucuronide in plasma and urine following oral and dermal exposure in volunteers for the interpretation of biomonitoring data. *Environment international*, 138, 105644. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105644>

Kim, M. J., Moon, M. K., Kang, G. H., Lee, K. J., Choi, S. H., Lim, S., Oh, B. C., Park, D. J., Park, K. S., Jang, H. C., & Park, Y. J. (2014). Chronic exposure to bisphenol A can accelerate atherosclerosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovascular toxicology*, 14(2), 120–128. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9235-x>

Kokai, D., Stanic, B., Samardzija Nenadov, D., Pogrmic-Majkic, K., Tesic, B., Fa, S., & Andric, N. (2020). Biological effects of chronic and acute exposure of human endothelial cell line EA.hy926 to bisphenol A: New tricks from an old dog. *Chemosphere*, *256*, 127159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127159>

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International journal of molecular sciences*, *20*(18), 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*, *300*(11), 1303–1310. <https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303>

Lavie, C. J., Ozemek, C., Carbone, S., Katzmarzyk, P. T., & Blair, S. N. (2019). Sedentary Behavior, Exercise, and Cardiovascular Health. *Circulation research*, *124*(5), 799–815. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312669>

Le, H. H., Carlson, E. M., Chua, J. P., & Belcher, S. M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology letters*, *176*(2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.11.001>

Leopold, J. A., & Loscalzo, J. (2008). Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. *Drug discovery today. Therapeutic strategies*, *5*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2008.02.001>

Li, C., Pan, Y., Zhang, R., Huang, Z., Li, D., Han, Y., Larkin, C., Rao, V., Sun, X., & Kelly, T. N. (2023). Genomic Innovation in Early Life Cardiovascular Disease Prevention and Treatment. *Circulation research*, *132*(12), 1628–1647. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321999>

Lind, P. M., & Lind, L. (2011). Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly. *Atherosclerosis*, *218*(1), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.001>

Lingappan K. (2018). NF-κB in Oxidative Stress. *Current opinion in toxicology*, *7*, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.002>

Liu, Y., Mei, C., Liu, H., Wang, H., Zeng, G., Lin, J., & Xu, M. (2014). Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochemical and biophysical research communications*, 451(4), 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.031>

Malone, L. A., & Felling, R. J. (2019). Pediatric stroke: unique implications of the immature brain on injury and recovery. *Pediatric Neurology*.doi:10.1016/j.pediatrneurol.20

Meli, R., Monnolo, A., Annunziata, C., Pirozzi, C., & Ferrante, M. C. (2020). Oxidative Stress and BPA Toxicity: An Antioxidant Approach for Male and Female Reproductive Dysfunction. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(5), 405. <https://doi.org/10.3390/antiox9050405>

Melzer, D., Rice, N. E., Lewis, C., Henley, W. E., & Galloway, T. S. (2010). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS one*, 5(1), e8673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008673>

Millett, E. R. C., Peters, S. A. E., & Woodward, M. (2018). Sex differences in risk factors for myocardial infarction: cohort study of UK Biobank participants. *BMJ (Clinical research ed.)*, 363, k4247. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4247>

Mlynarcikova, A., & Scsukova, S. (2021). Bisphenol analogs AF and S: Effects on cell status and production of angiogenesis-related factors by COV434 human granulosa cell line. *Toxicology and applied pharmacology*, 426, 115634. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115634>

Montague, S. J., Lim, Y. J., Lee, W. M., & Gardiner, E. E. (2020). Imaging Platelet Processes and Function-Current and Emerging Approaches for Imaging *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in immunology*, 11, 78. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00078>

NCBI (2023) Cardiovascular diseases, MeSH, <https://bit.ly/3MRIYmj>

Olvera-Lopez, E., Ballard, B.D., Jan, A. (2022) cardiovascular disease, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), NCBI, <https://bit.ly/3WycT6f>

Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., & Fournel-Gigleux, S. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 349. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00349>

Omrani-Nava, V., Hedayatzadeh-Omran, A., Alizadeh-Navaei, R., Mokhberi, V., Jalalian, R., Janbabaee, G., Amjadi, O., Rahmatpour, G., & Mozaffari, A. (2018). TP53 single nucleotide

polymorphism (rs1042522) in Iranian patients with coronary artery disease. *Biomedical reports*, 9(3), 259–265. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1121>

Pandey, A., Salahuddin, U., Garg, S., Ayers, C., Kulinski, J., Anand, V., Mayo, H., Kumbhani, D. J., de Lemos, J., & Berry, J. D. (2016). Continuous Dose-Response Association Between Sedentary Time and Risk for Cardiovascular Disease: A Meta-analysis. *JAMA cardiology*, 1(5), 575–583. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.1567>

Parchem (2017) Safety Data Sheet (Bisphenol A), Parchem, fine & specialty chemicals, retrieved from: <https://www.parchem.com/siteimages/Attachment/GHS%20Bisphenol%20A%20MSDS.pdf>

Parkinson, L., (2022) Germany submits bisphenol restriction proposal, Food, Packaging forum, retrieved from: <https://www.foodpackagingforum.org/news/germany-submits-bisphenol-restriction-proposal-to-echa>.

Piano M. R. (2017). Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol research : current reviews*, 38(2), 219–241.

Pombo, M., Castro-Feijóo, L., Barreiro, J., Cabanas, P., (2020) Una revisión sobre los disruptores endocrinos y su posible impacto sobre la salud de los humanos, *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2020; Volumen 11. Número 2, 10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2020.Nov.619

Pons, S., Arnaud, M., Loïsele, M., Arri, E., Azoulay, E., & Zafrani, L. (2020). Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. *Critical care clinics*, 36(2), 401–413. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.001>

Poznyak, A. V., Grechko, A. V., Orekhova, V. A., Khotina, V., Ivanova, E. A., & Orekhov, A. N. (2020). NADPH Oxidases and Their Role in Atherosclerosis. *Biomedicines*, 8(7), 206. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070206>

Qiu, W., Yang, M., Liu, J., Xu, H., Luo, S., Wong, M., & Zheng, C. (2019). Bisphenol S-induced chronic inflammatory stress in liver via peroxisome proliferator-activated receptor γ using fish in vivo and in vitro models. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 246, 963–971. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.039>

Quagliariello, V., Coppola, C., Mita, D. G., Piscopo, G., Iaffaioli, R. V., Botti, G., & Maurea, N. (2019). Low doses of Bisphenol A have pro-inflammatory and pro-oxidant effects, stimulate lipid peroxidation

and increase the cardiotoxicity of Doxorubicin in cardiomyoblasts. *Environmental toxicology and pharmacology*, 69, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.006>

R&D Systems (2023) Protocol for the Preparation and Fluorescent ICC Staining of Cells on Coverslips, biotechne, <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/protocol-preparation-and-fluorescent-icc-staining-cells-coverslips>

Reineke, N. (2023) Restriction for BPA and bisphenols of similar concern: small steps forward, but the piecemeal approach continues, Chemtrust, retrieved from: https://chemtrust.org/bisphenols_restriction_2023/.

Ricard, N., Bailly, S., Guignabert, C., & Simons, M. (2021). The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nature reviews. Cardiology*, 18(8), 565–580. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00517-4>

Rodgers, J. L., Jones, J., Bolleddu, S. I., Vanthenapalli, S., Rodgers, L. E., Shah, K., Karia, K., & Panguluri, S. K. (2019). Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging. *Journal of cardiovascular development and disease*, 6(2), 19. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020019>

Roerecke M. (2021). Alcohol's Impact on the Cardiovascular System. *Nutrients*, 13(10), 3419. <https://doi.org/10.3390/nu13103419>

Rotimi, O. A., Olawole, T. D., De Campos, O. C., Adelani, I. B., & Rotimi, S. O. (2021). Bisphenol A in Africa: A review of environmental and biological levels. *The Science of the total environment*, 764, 142854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142854>

Salvador, B., Arranz, A., Francisco, S., Córdoba, L., Punzón, C., Llamas, M. Á., & Fresno, M. (2016). Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacological research*, 108, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.038>

Sendra, M., Štampar, M., Fras, K., Novoa, B., Figueras, A., & Žegura, B. (2023). Adverse (geno)toxic effects of bisphenol A and its analogues in hepatic 3D cell model. *Environment international*, 171, 107721. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107721>

SGS (2023) Food contact material regulations- Asia pacific Region, retrieved from: <https://www.sgs.com/en/services/food-contact-material-regulations-asia-pacific-region>.

SGS (2023) Food contact material regulations- Mercosur Region, retrieved from: <https://www.sgs.com/en/services/food-contact-material-regulations-mercosur-region>.

Sheng, Z., Wang, C., Ren, F., Liu, Y., & Zhu, B. (2019). Molecular mechanism of endocrine-disruptive effects induced by Bisphenol A: The role of transmembrane G-protein estrogen receptor 1 and integrin $\alpha\beta3$. *Journal of environmental sciences (China)*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.05.002>

Shrivastav, A., Swetanshu, & Singh, P. (2024). The Impact of Environmental Toxins on Cardiovascular Diseases. *Current problems in cardiology*, 49(1 Pt C), 102120. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.102120>

SinoBiological (2023) What is immunocytochemistry?, USA, <https://www.sinobiological.com/category/what-is-icc>

Soufi M, Sattler AM, Kurt B, Schaefer JR. Mutation Screening of the APOA5 Gene in Subjects with Coronary Artery Disease. *Journal of Investigative Medicine*. 2012;60(7):1015-1019. doi:[10.2310/JIM.0b013e3182686918](https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e3182686918)

Sui, Y., Park, S. H., Helsley, R. N., Sunkara, M., Gonzalez, F. J., Morris, A. J., & Zhou, C. (2014). Bisphenol A increases atherosclerosis in pregnane X receptor-humanized ApoE deficient mice. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), e000492. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.00049>

Tada, H., Fujino, N., Hayashi, K., Kawashiri, M. A., & Takamura, M. (2022). Human genetics and its impact on cardiovascular disease. *Journal of cardiology*, 79(2), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2021.09.005>

ThermoFisher (2005) MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator *for live-cell imaging* (M36008), molecular probes, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp36008.pdf>

ThermoFisher (2003) Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (G-7921), Molecular Probes, <https://shorturl.at/ayDZ5>

Thermofisher (2023) Invitrogen™ Countess™ 3 FL Automated Cell Counter, fisher scientific, <https://www.fishersci.es/shop/products/countess-3-fl-automated-cell-counter-1/16832556>

Tibaut, M., Caprnda, M., Kubatka, P., Sinkovič, A., Valentova, V., Filipova, S., Gazdikova, K., Gaspar, L., Mozos, I., Egom, E. E., Rodrigo, L., Kruzliak, P., & Petrovic, D. (2019). Markers of Atherosclerosis: Part 1 - Serological Markers. *Heart, lung & circulation*, 28(5), 667–677. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.06.1057>

Tirichen, H., Yaigoub, H., Xu, W., Wu, C., Li, R., & Li, Y. (2021). Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Frontiers in physiology*, 12, 627837. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.627837>

Tuzimski, T.; Szubartowski, S.; Stupak, A.; Kwaśniewski, W.; Szultka-Młyńska, M.; Kwaśniewska, A.; Buszewski, B. (2023) The Association between the Bisphenols Residues in Amniotic Fluid and Fetal Abnormalities in Polish Pregnant Women—Its Potential Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 730. <https://doi.org/10.3390/ijms24010730>

Uniprot (2024) UGT Human, retrieved from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=UGT+human>

Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 731, 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20

Xiong, S., Wang, Y., Li, H. *et al.* (2017) Low Dose of Bisphenol A Activates NF-κB/IL-6 Signals to Increase Malignancy of Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol* **37**, 1095–1103. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0443-3>

Wang, R., Fei, Q., Liu, S. *et al.* (2022) The bisphenol F and bisphenol S and cardiovascular disease: results from NHANES 2013–2016. *Environ Sci Eur* 34, 4 . <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00586-9>

Wautier, J.-L.; Wautier, M.-P. Vascular Permeability in Diseases. *Int. J.Mol.Sci.*2022,23,3645. <https://doi.org/10.3390/ijms23073645>

Waidyanatha, S., Black, S. R., Aillon, K., Collins, B., Patel, P. R., Riordan, F., Sutherland, V., Robinson, V. G., Fernando, R., & Fennell, T. R. (2019). Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: A dose, species, and sex comparison. *Toxicology and applied pharmacology*, 373, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.04.015>

WHO (2023) Cardiovascular diseases, Health Topics, <https://bit.ly/41XjIQ5>

Wu, F., Liu, L., & Zhou, H. (2017). Endothelial cell activation in central nervous system inflammation. *Journal of leukocyte biology*, *101*(5), 1119–1132. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0816-352RR>

Wu, M. D., Atkinson, T. M., & Lindner, J. R. (2017). Platelets and von Willebrand factor in atherogenesis. *Blood*, *129*(11), 1415–1419. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-692673>

Yalcin, E. B., Kulkarni, S. R., Slitt, A. L., & King, R. (2016). Bisphenol A sulfonation is impaired in metabolic and liver disease. *Toxicology and applied pharmacology*, *292*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.009>

Yu, Fei & Bai, Xueting & Yang, Changfu & Ma, Jie. (2019). Reduced Graphene Oxide–P25 Nanocomposites as Efficient Photocatalysts for Degradation of Bisphenol A in Water. *Catalysts*. *9*. 607. [10.3390/catal9070607](https://doi.org/10.3390/catal9070607).

Zellx (sf) H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit (1000 assays), Zellbio GmbH (Germany) CAT No. ZX-11104-1000, <https://zellx.de/docs/manuals/ZELLX-H2DCFDA-Cellular-ROS-Assay-Kit-ZX-11104-1000.pdf>

Zhang, Y. B., Pan, X. F., Chen, J., Cao, A., Xia, L., Zhang, Y., Wang, J., Li, H., Liu, G., & Pan, A. (2021). Combined lifestyle factors, all-cause mortality and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of epidemiology and community health*, *75*(1), 92–99. <https://doi.org/10.1136/jech-2020-214050>

Zhao, J., Yang, M., & Wu, J. (2021). CXCL16 may be a predisposing factor to atherosclerosis: An animal study. *Molecular medicine reports*, *24*(4), 716. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12355>

Zhao, C., Tang, Z., Yan, J., Fang, J., Wang, H., & Cai, Z. (2017). Bisphenol S exposure modulate macrophage phenotype as defined by cytokines profiling, global metabolomics and lipidomics analysis. *The Science of the total environment*, *592*, 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.035>

Zheng, D., Liu, J., Piao, H., Zhu, Z., Wei, R., & Liu, K. (2022). ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. *Frontiers in immunology*, *13*, 1039241. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1039241>

Zhu, J., Jiang, L., Liu, Y. *et al.* MAPK and NF- κ B Pathways Are Involved in Bisphenol A-Induced TNF- α and IL-6 Production in BV2 Microglial Cells. *Inflammation* **38**, 637–648 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9971-5>

Ziegler, K., Tumova, S., Kerimi, A., Williamson, G (2015). Cellular Cellular Asymmetric Catalysis by UDP-glucuronosyltransferase 1A8 Shows Functional Localization to the Basolateral Plasma Membrane, *Journal of Biochemistry*, Volume 290, issue 12, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.634428>