

Modelagem de riscos cardiovasculares de e-cigarros com células endoteliais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos



Won Hee Lee, PHD,^{a,b,*} Sang-Ging Ong, PHD,^{a,c,d,*} Yang Zhou, MS,^a Lei Tian, PHD,^a Hye Ryeong Bae, BS,^a Natalie Baker, BS,^a Adam Whitlatch, BS,^e Leila Mohammadi, MD, PHD,^f Hongchao Guo, PHD,^{a,g} Kari C. Nadeau, MD, PHD,^h Matthew L. Springer, PHD,^{e,f} Suzaynn F. Schick, PHD,ⁱ Aruni Bhatnagar, PHD,^j Joseph C. Wu, MD, PHD^{a,g}

RESUMO

CONTEXTO Houve um grande aumento no uso de cigarros eletrônicos (e-cigarros). Diferentemente dos efeitos de cigarros convencionais, há poucos estudos sobre os efeitos dos e-cigarros e seus componentes na mediação da saúde vascular. Porém, devido à sua crescente popularidade, é imperativo avaliar os riscos dos e-cigarros para a saúde, incluindo os efeitos dos seus ingredientes, especialmente a nicotina e os aromatizantes.

OBJETIVOS O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de líquidos aromatizantes (e-líquidos) e soros isolados de e-cigarros sobre seus usuários quanto à saúde endotelial e à ativação de macrófagos dependentes de células endoteliais.

MÉTODOS Foram usadas células endoteliais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (iPSC-ECs) e uma abordagem de triagem de alto rendimento para avaliar a integridade endotelial após a exposição a seis e-líquidos diferentes com concentrações variadas de nicotina e ao soro de usuários de e-cigarros.

RESULTADOS A citotoxicidade dos e-líquidos variou consideravelmente, com o produto com sabor de canela sendo o mais potente e o que leva a uma viabilidade celular significativamente diminuída, ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), à atividade da caspase 3/7, à captação de lipoproteínas de baixa densidade, à ativação da via relacionada ao estresse oxidativo e ao comprometimento da formação e migração de tubo, confirmando a disfunção endotelial. Com a exposição das ECs ao e-líquido, o meio condicionado induziu a polarização dos macrófagos a um estado pró-inflamatório, gerando a produção de interleucina-1 β e -6 e levando ao aumento de ERO. Após a exposição de iPSC-ECs por humanos ao soro de usuários de e-cigarros, foi observado um aumento de ERO ligadas à disfunção endotelial, conforme indicado por propriedades pró-angiogênicas comprometidas. Também foi observado um aumento na expressão de citocinas inflamatórias no soro de usuários de e-cigarros.

CONCLUSÕES A exposição aguda ao uso de e-líquidos ou e-cigarros com sabor exacerba a disfunção endotelial, o que, muitas vezes, precede as doenças cardiovasculares. (J Am Coll Cardiol 2019;73:2722-37) © 2019 pela American College of Cardiology Foundation.



Ouça o áudio com o resumo deste artigo, apresentado pelo editor-chefe, Dr. Valentin Fuster, em JACC.org.

^aStanford Cardiovascular Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, EUA; ^bDepartment of Basic Medical Sciences, University of Arizona College of Medicine, Phoenix, Arizona, EUA; ^cDepartment of Pharmacology, University of Illinois College of Medicine, Chicago, Illinois, EUA; ^dDivision of Cardiology, Department of Medicine, University of Illinois College of Medicine, Chicago, EUA, Illinois; ^eDepartment of Medicine, Division of Cardiology, University of California, San Francisco, California, EUA; ^fDepartment of Medicine, Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco, California, EUA; ^gDepartment of Medicine, Division of Cardiology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, EUA; ^hSean N. Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, EUA; ⁱSchool of Medicine, Division of Occupational and Environmental Medicine, University of California, San Francisco, California, EUA; ^jDivision of Cardiovascular Medicine, University of Louisville School of Medicine, Louisville, Kentucky, EUA. A Dra. Lee e o Dr. Ong contribuíram igualmente para este trabalho. Este trabalho recebeu subsídios do American Heart Association (AHA) Scientist Development Grant 16SDG27560003 (para a Dra. Lee), uma recompensa Pilot Award do Stanford Diabetes Research Center de um subsídio concedido pelo National Institutes of Health (NIH) P30DK116074 (para a Dra. Lee), NIH R00 HL130416 (para o Dr. Ong), NIH R01 HL141371 (para o Dr. Wu), University of California Tobacco Related Disease Research Program 27IR-0012 (para o Dr. Wu), AHA 17MERT33610009 (para o Dr. Wu), NIH P50-CA-180890-01 e U.S. Food and Drug Administration Center for Tobacco Products (para a Dra. Schick), University of California Tobacco Related Disease Research Program 24RT-0039 (para a Dra. Schick), NIH R01 HL120062 e o U.S. Food and Drug Administration Center for Tobacco Products (para o Dr. Springer), and NIH U54 HL120163 (para o Dr. Bhatnagar). A esposa do Dr. Springer está em conselhos consultivos da Bayer, ADC Therapeutics e Seattle Genetics. O Dr. Wu é cofundador da Khloris Biosciences, mas não tem interesses conflitantes, já que o trabalho apresentado aqui é totalmente independente. Todos os demais autores informaram não ter relações relevantes para os conteúdos deste artigo a serem declaradas.

O tabagismo é responsável por uma em cada três mortes que resultam de doença cardiovascular (DCV), levando a > 480.000 mortes prematuras por ano somente nos Estados Unidos (1). Embora os efeitos prejudiciais do tabagismo convencional sobre DCV estejam bem documentados e a prevalência do tabagismo esteja em declínio, está havendo um aumento explosivo no uso de cigarros eletrônicos (e-cigarros), especialmente entre os jovens, com escassa evidência científica sobre sua toxicidade e efeitos sobre a saúde (2,3).

Os e-cigarros são dispositivos projetados para fornecer um aerossol contendo nicotina após o aquecimento de uma solução líquida (frequentemente chamada de e-líquido ou e-suco) que tipicamente usa propileno-glicol (PG) e/ou glicerol (glicerina) como um veículo para a nicotina e agentes aromatizantes. Embora os e-cigarros sejam relativamente novos no mercado, eles são uma alternativa cada vez mais popular aos cigarros de tabaco convencionais, contando com uma ampla variedade de tipos e marcas de produtos. Em 2014, havia 450 produtos de e-cigarros com cerca de 8.000 sabores únicos disponíveis (4). Ainda que a maioria dos químicos aromatizantes em e-líquidos satisfaça o padrão de segurança reconhecido globalmente em relação à ingestão como aditivos alimentares, eles não foram testados como inalantes adequadamente. Na verdade, alguns aromatizantes populares são conhecidos por serem tóxicos, incluindo diacetil (sabor amanteigado), acetil propionil (sabor caramelo ou amanteigado) e benzaldeído (sabor frutado). Recentemente, a Food and Drug Administration divulgou uma declaração limitando as vendas de e-cigarros aromatizados, com a exceção dos sabores tabaco, mentol e hortelã, como um esforço para evitar uma nova geração de viciados em nicotina (5). Apesar do rápido aumento de popularidade, o potencial de efeitos cardiovasculares prejudiciais após o uso de químicos aromatizantes de cigarros inalados tem sido amplamente inexplorado.

Até a data, os estudos toxicológicos realizados em e-cigarros têm sido limitados principalmente a estudos de citotoxicidade usando linhas celulares estabelecidas. Inicialmente, estudos limitados de vapor de e-cigarros mostraram que eles apresentavam níveis muito mais baixos de carcinógenos em aerossóis em comparação à fumaça do cigarro convencional (6,7). Atualmente, o risco cardiovascular de e-cigarros não é claro; no entanto, foi demonstrado que alguns e-líquidos são citotóxicos em modelos celulares, incluindo fibroblastos pulmonares, células-tronco embrionárias humanas e células-tronco neurais (6,8).

O endotélio vascular desempenha um importante papel na função vascular por meio da elaboração de fatores parácrinos que regulam o tônus vascular, a adesão

celular, a fibrinólise e o fluxo sanguíneo (9). O tabagismo causa disfunção endotelial, que é um fator de risco para DCV (10). Uma das hipóteses estudadas foi de que o uso de e-cigarros está associado ao dano das células endoteliais, levando à disfunção endotelial aguda (11), mas estudos mais aprofundados se fazem necessários. Apesar do uso extensivo de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) em outras áreas de pesquisa, nenhum estudo anterior estimulou a poderosa plataforma de células endoteliais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (iPSC-ECs) para avaliar os riscos potenciais à saúde de e-cigarros quanto à integridade endotelial. Aqui, usamos iPSC-ECs para avaliar os efeitos de e-líquidos com sabor na saúde endotelial e para entender a conversa entre células endoteliais e macrófagos. Fizemos uma validação mais profunda de nossos resultados usando soro coletado de usuários de e-cigarros e fumantes de cigarros convencionais para avaliar os efeitos potenciais do uso de e-cigarros na função cardiovascular.

MÉTODOS

Os métodos detalhados e os dados de suporte estão disponíveis no Apêndice On-line.

DIFERENCIAÇÃO DE IPSC-ECs. As iPSCs (acima de 20) de três indivíduos saudáveis foram divididas em uma proporção de 1:12 usando EDTA, conforme descrito anteriormente (12), e foram cultivadas por 3 a 4 dias até atingirem ~75% de confluência. Para obter o protocolo de diferenciação e caracterização de células endoteliais, consulte o Apêndice On-line.

LÍQUIDOS DE E-CIGARRO (E-LÍQUIDOS). Seis e-líquidos diferentes foram comprados on-line: Freedom Smoke USA (Tucson, Arizona, EUA), Johnson Creek (Johnson Creek, Wisconsin, EUA) e E Liquid Market (Birmingham, Alabama, EUA) com concentrações de nicotina de 0, 6 e 18 mg/mL, os quais foram armazenados a 4 °C no escuro (Tabela On-line 1). Os frascos foram escolhidos para representar os três tipos de veículos mais comuns [50% PG/50% glicerina vegetal (GV), 80% PG/20% GV e 100% GV] e diversos sabores populares.

COLETA DE AMOSTRAS DE SORO DOS PACIENTES. A população de sujeitos foi composta por cinco não fumantes saudáveis (não fumantes), cinco fumantes ativos de cigarros (cigarro) e dois usuários duplos de e-cigarros e cigarros, bem como dois usuários únicos de e-cigarros (e-cigarro). Incluímos o soro de usuários únicos de e-cigarros e de usuários duplos de e-cigarros e cigarros convencionais em nosso estudo porque

ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

DCV = doença cardiovascular
e-cigarro = cigarro eletrônico
e-líquidos = líquidos de cigarro eletrônico
ERO = espécie reativa de oxigênio
GV = glicerina vegetal
iPSC-ECs = células endoteliais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas
PG = propileno-glicol
PLT = plaqueta

ambos os padrões de uso são comuns. Nós juntamos os dois tipos de usuários em um único grupo (e-cigarro), pois os participantes recrutados, na sua maioria, eram tradicionalmente fumantes em longo prazo que haviam iniciado o uso de e-cigarros como uma alternativa para o consumo de cigarros convencionais. Isso também se deve ao fato de a população recrutada ter uma média de idade média de 29 anos, enquanto a maioria dos usuários de e-cigarro sem histórico prévio de tabagismo tende a ser mais jovem. Dependendo da população e da escrita das questões, 25% a 70% dos usuários de e-cigarro se descrevem como usuários duplos (13,14). Os participantes classificados como usuários de e-cigarros relataram o uso do equipamento em média $27,5 \pm 5,0$ dias/mês, com $9,8 \pm 3,3$ sessões de uso (> 2 baforadas) por dia. Os usuários duplos fumavam < 2 maços de cigarros/mês. Os fumantes de cigarro convencional relataram $29,8 \pm 0,4$ dias de consumo nos últimos 30 dias e $10,1 \pm 3,4$ cigarros/dia. Todos os sujeitos eram indivíduos saudáveis, sem outros fatores de risco cardiovasculares maiores. As características demográficas e clínicas dos sujeitos estão resumidas na Tabela On-line 2. Todos os participantes concederam o consentimento informado, e a condução do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Califórnia em São Francisco.

Os participantes do estudo foram solicitados a não usar cigarros convencionais por 7 dias antes de todas as visitas de estudo e a se absterem do uso de cigarros, e-cigarros, alimentos e bebidas com cafeína por 12 h antes do dia do estudo. Para garantir a abstinência dos produtos de tabaco, os níveis de monóxido de carbono (CO) e de nicotina foram testados no início de cada visita. Para o estudo com e-cigarro, os sujeitos usaram um e-cigarro contendo e-líquido com sabor RY4 (Changning Dekang Ltd, Shenzhen, China) com 16 mg/mL de nicotina e com instrução para usá-lo por um total de 10 min (uma tragada de 2 s a cada 30 s). Para a condição com cigarro, os indivíduos fumaram um cigarro Marlboro por 10 min ou até que o cigarro terminasse (duas tragadas de 2 s por minuto).

ANÁLISE ESTATÍSTICA. A análise estatística e os gráficos de dados foram realizados com o SigmaPlot versão 13.0 (Systat Software, San Jose, California, EUA). Para as comparações entre dois grupos, foram usados um teste t de Student bicaudal pareado ou não para variáveis distribuídas normais e um teste U de Mann-Whitney para variáveis distribuídas não normais. Diferenças de > 2 grupos foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) com análise *post hoc* de Bonferroni. Quando havia > 2 variáveis independentes presentes, foi usada uma ANOVA de dois fatores com correção de Bonferroni. Para testar as alterações em série, foi utilizada uma ANOVA de repetição de medidas de uma via. A distribuição normal foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilks.

Todos os dados foram resumidos como média \pm DP ou média \pm EPM, e a correção de Bonferroni foi usada para comparações diversas conforme indicado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

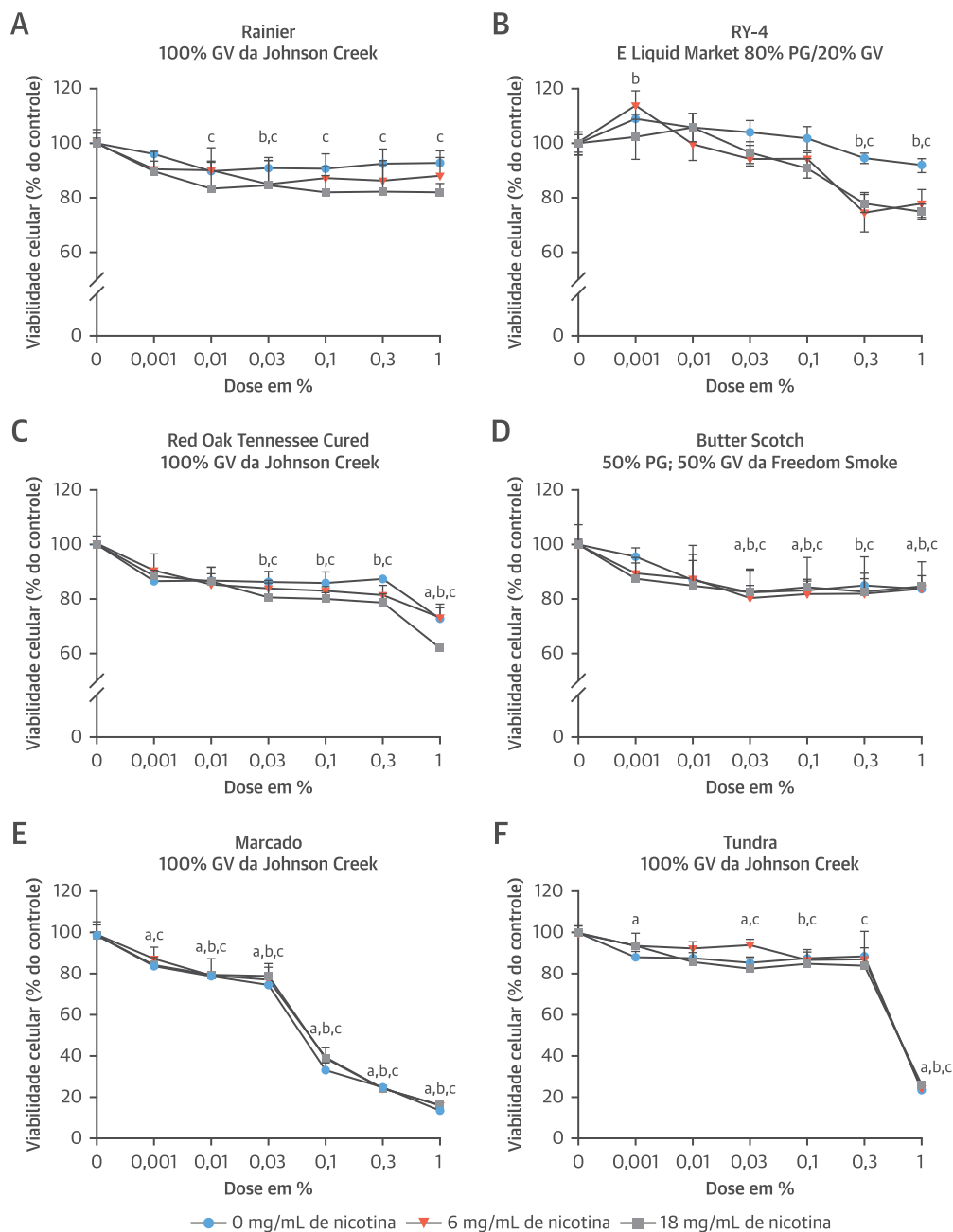
RESULTADOS

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR, GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E APOPTOSE EM iPSC-ECs APÓS EXPOSIÇÃO A LÍQUIDOS DE E-CIGARRO. As iPSCs de três indivíduos saudáveis foram diferenciadas em ECs com o uso de condições quimicamente definidas (Figura On-line 1A). Após a purificação de CD144, as iPSC-ECs mantiveram sua identidade, conforme demonstrado por uma expressão mais elevada de genes marcadores e proteínas específicas do endotélio (Figuras On-line 1B a 1E). A imunocoloração apresentou um aumento na expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) durante estimulação do fator de necrose tumoral α citocina. A captação lipídica também foi confirmada usando lipoproteína de baixa densidade (LDL) acetilada fluorescente, demonstrando a funcionalidade *in vitro* dessas iPSC-ECs.

Para examinar os efeitos de e-líquidos na viabilidade celular, as iPSC-ECs foram tratadas com diluições seriadas de seis e-líquidos disponíveis comercialmente em concentrações variadas de nicotina (0, 6 e 18 mg/mL) por 48 h (Tabela On-line 1). Nós observamos que e-líquidos com sabor apresentaram efeitos variados na sobrevivência celular. Enquanto o Rainier com sabor de frutas (Figura 1A), o tabaco doce com tons de RY4 de caramelo e baunilha (Figura 1B), Red Oak Tennessee Cured com sabor de tabaco (Figura 1C) e o Butter Scotch com sabor adocicado (Figura 1D) apresentaram efeitos citotóxicos moderados nos iPSC-ECs, o tratamento com Marcado com sabor de canela levou a um forte efeito citotóxico (Figura 1E). Além disso, o Tundra com sabor de tabaco mentolado (Figura 1F) também teve fortes efeitos citotóxicos nas iPSC-ECs com uma dose de concentração de 1% com ou sem nicotina.

O estresse oxidativo tem sido amplamente implicado como um fator importante na lesão endotelial (15). Para determinar se os e-líquidos regulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), os níveis de H₂O₂ em iPSC-ECs foram determinados após a exposição a doses crescentes de líquidos com sabor. Conforme mostrado na Figura 2, a maior parte da exposição a e-líquido por 48 horas, independentemente do sabor, levou ao aumento de H₂O₂ de uma maneira dose-dependente. Esse aumento de ERO foi especialmente acentuado quando as iPSC-ECs foram expostas a doses de 0,3% e 1% do e-líquido Marcado com sabor de canela (Figura 2E) ou a doses de 1% do e-líquido Tundra com sabor de tabaco mentolado (Figura 2F).

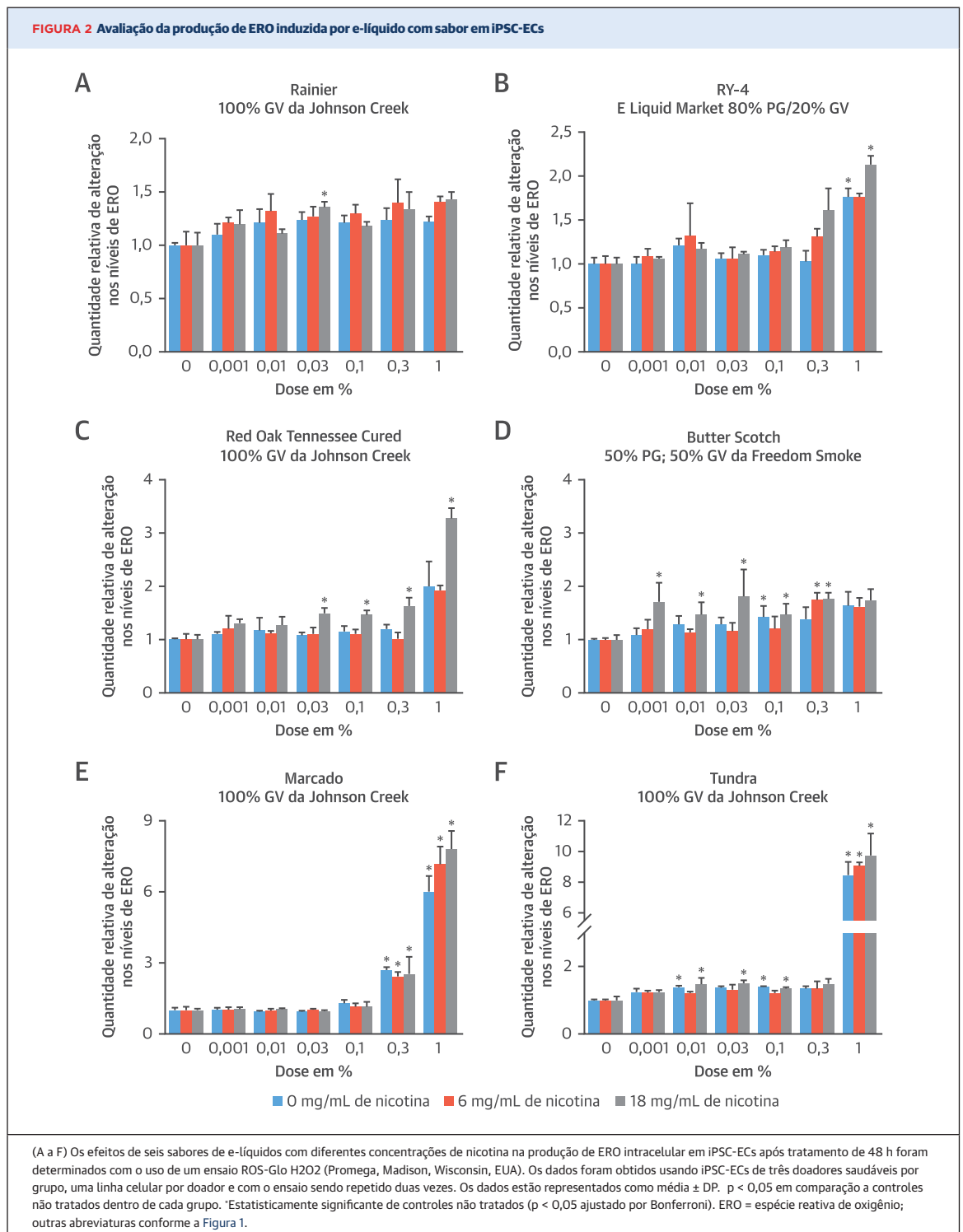
FIGURA 1 Avaliação da citotoxicidade induzida pelo sabor do e-líquido em iPSC-ECs



(A a F) Os efeitos de seis sabores de líquidos de cigarro eletrônico (e-líquido) com diferentes concentrações de nicotina na viabilidade de células endoteliais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC-EC) após tratamento de 48 h foram determinados com o uso de um ensaio luminescente CellTiter-Glo 2.0 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Os dados foram obtidos usando iPSC-ECs de três doadores saudáveis por grupo, uma linha celular por doador e com o ensaio sendo repetido duas vezes. Os dados estão representados como média ± DP. *p < 0,05, em comparação a controles não tratados dentro de 0 mg/mL do grupo de nicotina; ^bp < 0,05 em comparação a controles não tratados dentro de 6 mg/mL do grupo de nicotina; ^cp < 0,05 em comparação a controles não tratados dentro de 18 mg/mL do grupo de nicotina. ^{abc}Estatisticamente significante de controles não tratados (p < 0,05 ajustado por Bonferroni). GV = glicerina vegetal; PG = propilenoglicol.

Para elucidar os mecanismos subjacentes à redução de viabilidade de iPSC-EC pela exposição a e-líquido, em seguida examinamos as atividades de caspase-3 e -7 em iPSC-ECs após tratamentos com e-

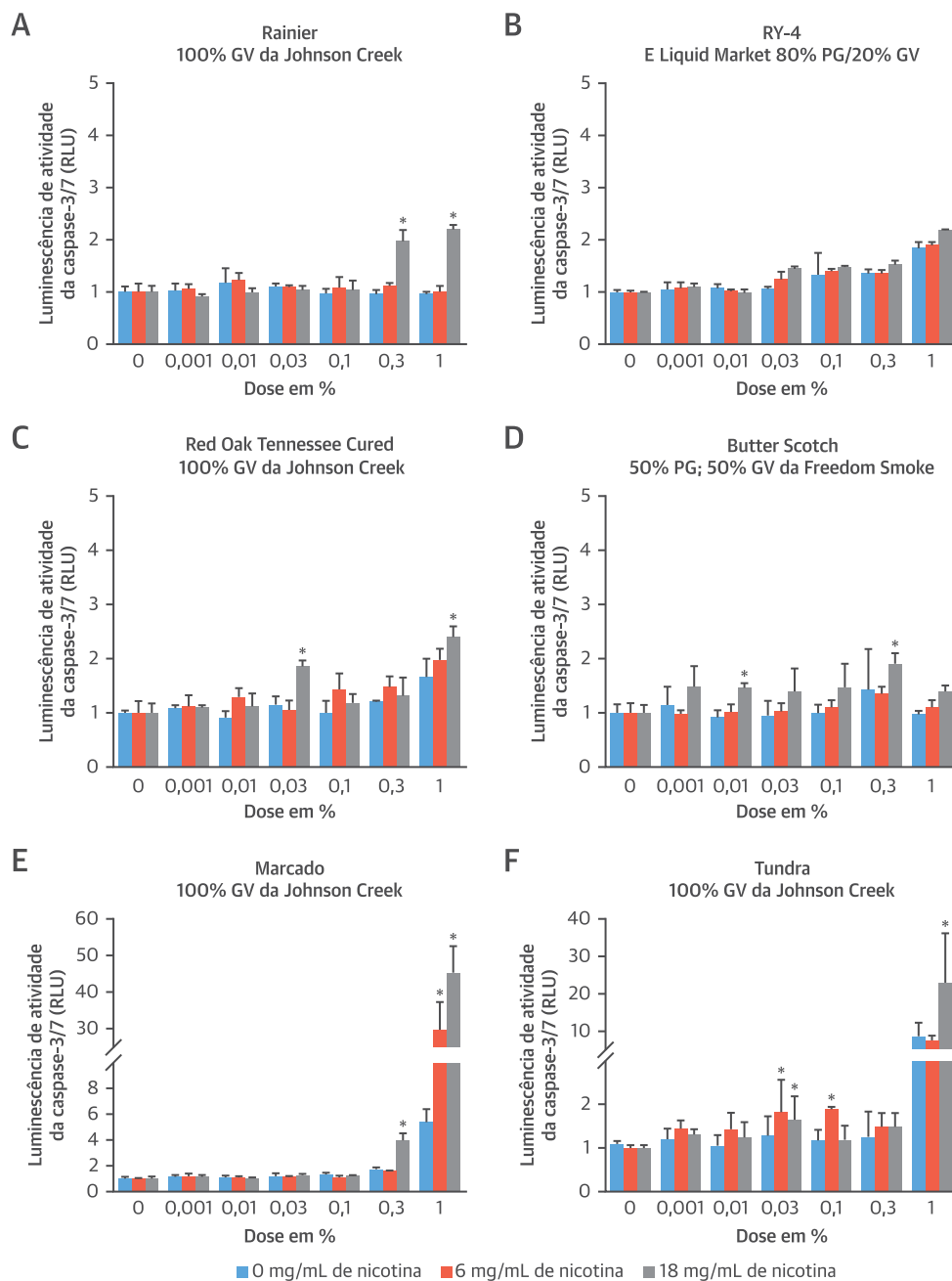
líquido. Ambas as caspases foram significativamente mais ativas em iPSC-ECs tratadas com a maioria dos e-líquidos em comparação aos controles, e a resposta máxima foi observada quando as células foram



tratadas com e-líquidos Marcado ou Tundra com sabor (Figura 3). Em todos os parâmetros medidos, incluindo citotoxicidade, geração de ERO e atividades apoptóticas, observamos uma tendência crescente à medida que a concentração de nicotina aumentava,

embora a diferença geral não tenha sido significativa. Por fim, dois solventes que foram usados em todos os seis e-líquidos com sabor, GV e PG, não afetaram a viabilidade celular, o nível de ERO nem as atividades da caspase (Figura On-line 2).

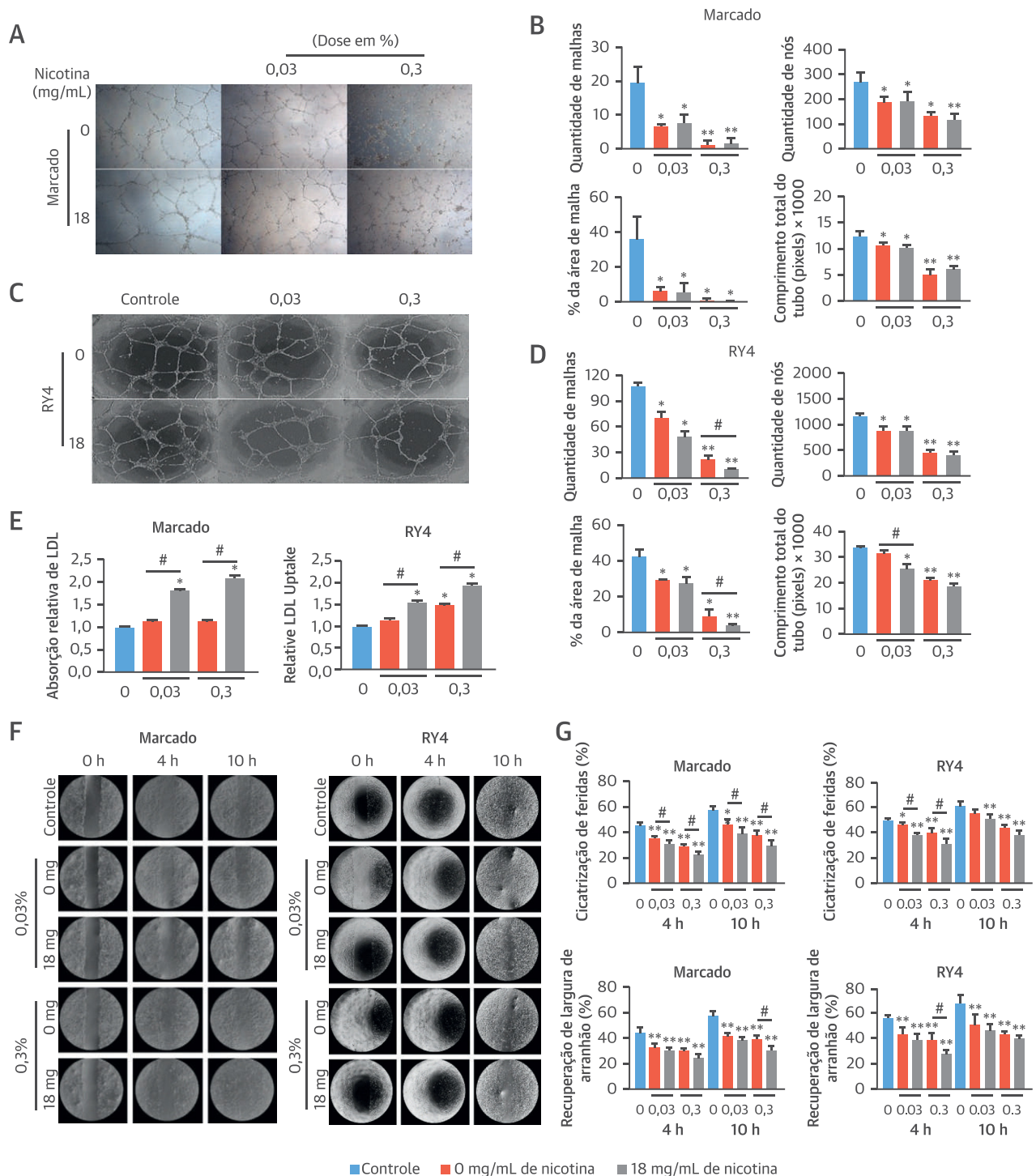
FIGURA 3 Avaliação da atividade da caspase 3/7 induzida por e-líquido com sabor em iPSC-ECs



(A a F) Os efeitos de seis sabores de e-líquidos com diferentes concentrações de nicotina na atividade de caspase 3/7 para apoptose em iPSC-ECs após tratamento de 48 h foram determinados usando um Caspase-Glo 3/7 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Os dados foram obtidos usando iPSC-ECs de três doadores saudáveis por grupo, uma linha celular por doador e com o ensaio sendo repetido duas vezes. Os dados estão representados como média ± DP. *p < 0,05 em comparação a controles não tratados dentro de cada grupo. Estatisticamente significante de controles não tratados (p < 0,05 ajustado por Bonferroni). Abreviaturas conforme a Figura 1.

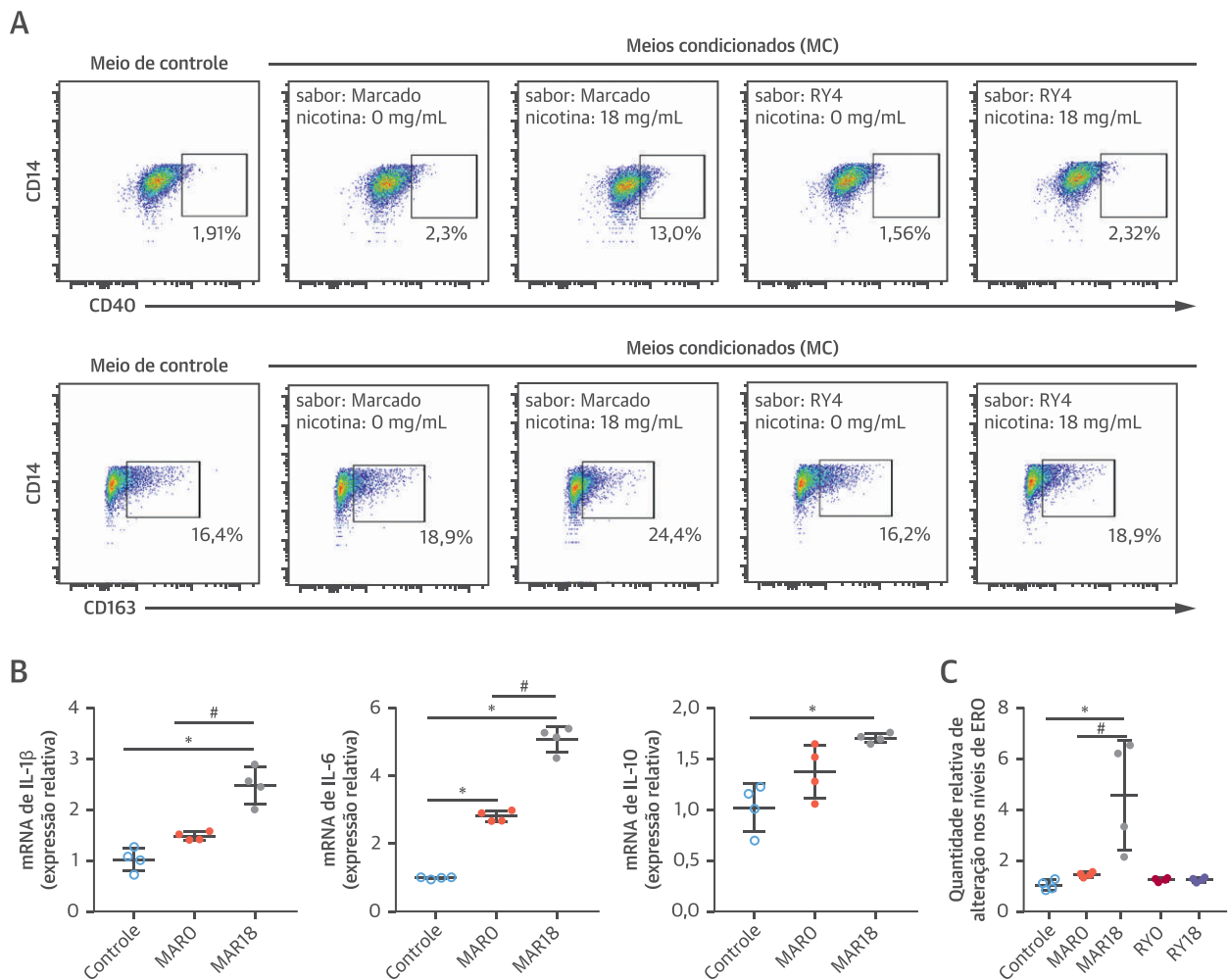
AValiação da função endotelial em iPSC-EC APÓS Adição de líquidos de e-cigarro. Nós investigamos a influência de e-líquidos na formação tubular de iPSC-ECs, o que reflete propriedades relevantes para a angiogênese. Os tubos foram avaliados 16 h após

a inoculação em meio de cultura suplementado com três e-líquidos: Marcado, RY4 e Tundra. A adição dos dois e-líquidos mais tóxicos, Marcado com sabor de canela (Figuras 4A e 4B) e Tundra com sabor de tabaco mentolado (Figura On-line 3A e 3B), levou a uma diminuição

FIGURA 4 Efeito do tratamento com líquido eletrolítico na função endotelial de iPSC-ECs

(A e C) As células foram incubadas com cada sabor de e-liquido durante 16 h para permitir a formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel (Corning, Bedford, Massachusetts, EUA) e depois fotografadas por microscopia de contraste de fase (x20). (B e D) Dados quantitativos do ensaio de formação de tubo. (E) A captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foi medida em iPSC-ECs após o tratamento do e-liquido durante 2 dias. (F) Imagens representativas e (G) dados quantitativos do ensaio de migração às 0, 4 e 10 h na presença dos sabores de e-liquido Marcado e RY4. Os dados de migração foram normalizados para o ponto de tempo 0 h. Os dados foram obtidos com o uso de iPSC-ECs de três doadores saudáveis por grupo, uma linha celular por doador e com o ensaio sendo repetido duas vezes. Os dados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em comparação a indivíduos controle; # $p < 0,05$ em comparação a grupos tratados com 0 mg/mL de nicotina. Abreviaturas conforme a Figura 1.

FIGURA 5 Efeito dos meios condicionados de iPSC-ECs tratados com e-líquido na polarização de macrófagos



(A) Os meios condicionados foram coletados de iPSC-ECs após 48 h de incubação com cada sabor e-líquido, depois foram expostos a células semelhantes a macrófagos por 48 h. O fenótipo dos macrófagos foi analisado por citometria de fluxo quanto aos marcadores M1 (CD40) e M2 (CD163). (B) Após 48 h de incubação com os meios condicionados, os meios foram substituídos por meios de cultura de macrófagos frescos por 16 h para determinar a expressão de citocinas e os níveis de ERO. A expressão das citocinas produzidas pelos macrófagos foi determinada pela reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa e quantitativa em tempo real. (C) Os níveis intracelulares de ERO produzidos por macrófagos foram determinados usando um ensaio ROS-Glo H2O2. Os dados estão representados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$, em comparação aos controles. # $p < 0,05$, em comparação aos grupos tratados com MAR0. ,* Estatisticamente significante de sujeitos controle ($p < 0,05$ ajustado por Bonferroni). MAR0 = e-líquido Marcado sem nicotina; MAR18 = e-líquido Marcado com 18 mg/mL de nicotina; RY0 = e-líquido RY4 sem nicotina; RY18 = e-líquido RY4 com 18 mg/mL de nicotina; outras abreviações conforme as Figuras 1 e 2.

significativa na quantidade de malhas e de nós, percentual de área de malha, e o comprimento total do tubo em iPSC-ECs em comparação com indivíduos controle. Achados semelhantes também foram observados em iPSC-ECs suplementadas com e-líquido menos tóxico, RY4 (Figuras 4C e 4D).

Em seguida, investigamos o efeito do e-líquido Marcado ou RY4 em funções endoteliais mais específicas, como a captação de LDL e lipídios e a migração celular. Nossos resultados indicam que a incubação com e-líquido

de ambos os sabores levou a uma maior captação de LDL (Figura 4E) e de ácidos graxos livres em iPSC-ECs (Figura On-line 3C), o que é um elo importante no início da inflamação e na função endotelial comprometida (16,17). O aumento na captação de LDL foi dependente da concentração de nicotina no e-líquido. Além disso, conforme mostrado nas Figuras 4F e 4G, a exposição a cada e-líquido causou uma redução significativa na migração de iPSC-EC, conforme determinado pela taxa de fechamento de ferida e recuperação da largura de

TABELA 1 Níveis de nicotina e cotinina no plasma na linha de base, imediatamente após e 1 e 3 h após fumar

	Basal	Imediatamente após	1 h após	3 h após	Valor-p*	Valor-pt
E-cig						
Nicotina	1,0 ± 0,6	12,3 ± 3,3 [†]	4,5 ± 0,8	2,3 ± 0,4	0,001	–
Cotinina	127,5 ± 16,7	116,8 ± 16,0	91,6 ± 30,4	82,0 ± 26,5 [†]	0,01	–
Cig						
Nicotina	0,6 ± 0,1	12,6 ± 1,9 [†]	5,8 ± 0,8 [†]	2,8 ± 0,4	< 0,001	0,04
Cotinina	99,4 ± 33,9	94,1 ± 32,5	96,9 ± 29,8	91,0 ± 27,7	–	–

Os valores são média ± EPM (em ng/mL). A linha de base foi definida como 1 h antes, e imediatamente após foi definido como 0 h. [†] Estatisticamente significativo da linha de base. Cig = cigarro; E-cig = e-cigarro.

arranhão. Da mesma forma, usando células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) como um controle positivo, descobrimos que os ácidos graxos livres são significativamente aumentados (Figura On-line 3D) e que a taxa de migração é bastante comprometida na presença de e-líquidos (Figuras On-line 3E e 3F). A maioria dos resultados quanto à migração celular foi independente da concentração de nicotina, sugerindo que o comprometimento observado das funções das células endoteliais está associado à combinação de aditivos de sabor e nicotina.

A CONVERSA ENTRE CÉLULAS ENDOTELIAIS E MACRÓFAGOS TRATADOS COM E-LÍQUIDO. Para entender o impacto do e-líquido na conversa entre células endoteliais e macrófagos, analisamos os macrófagos expostos a meios condicionados de iPSC-ECs tratados com e-líquido. Os meios condicionados de iPSC-ECs sem tratamento com e-líquido foram incluídos como uma condição de controle. Conforme mostrado na Figura 5A, os e-líquidos, como Marcado e RY4, acionaram a dupla polarização dos macrófagos em comparação aos grupos controle. Especialmente para o sabor Marcado, descobrimos que a porcentagem de macrófagos expressando CD40 (marcador M1) e CD163 (marcador M2) aumentou com os meios condicionados iPSC-EC tratados com 18 mg/mL de nicotina em comparação a 0 mg/mL de nicotina (13,0 ± 0,1% vs. 2,3 ± 0,2% e 24,4 ± 1,8% vs. 18,9 ± 1,6%, respectivamente).

Também examinamos os efeitos de meios condicionados coletados de iPSC-ECs tratados com e-líquido na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em macrófagos. Descobrimos que a exposição a meios condicionados de iPSC-ECs tratados com e-líquido Marcado aumentou significativamente os fatores inflamatórios produzidos pelos macrófagos M1, como a interleucina (IL)-1β e -6, e a citocina IL-10 relacionada ao M2 (Figura 5B), e não foram encontradas alterações significativas na expressão de citocinas em pessoas com e-líquido RY4 (dados não mostrados). Descobrimos também que os níveis de ERO intracelular nos macrófagos estavam significativamente maiores após o tratamento com meios condicionados de iPSC-ECs tratados com Marcado contendo 18 mg/mL de nicotina (Figura 5C).

EFEITOS DO TABAGISMO AGUDO E DO TABAGISMO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE NICOTINA E NAS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES.

Depois buscamos entender melhor os efeitos do uso de e-cigarros *in vivo*, recrutando não fumantes, fumantes de cigarros convencionais e usuários de e-cigarros (usuários únicos ou duplos com cigarros). Como a nicotina é o principal ingrediente ativo tanto dos e-cigarros quanto dos cigarros convencionais, foram avaliadas mudanças seriais nos níveis de nicotina e de seu metabólito mais próximo, a cotinina, no sangue dos participantes antes de (-1 h), imediatamente após (0 h) e 1 e 3 h após o uso. As concentrações séricas de nicotina antes do uso do produto de tabaco (-1 h) foram inferiores a 1,5 ng/mL em ambos os grupos, demonstrando a conformidade com a retenção durante a noite nos produtos de tabaco (Tabela 1). Em ambos os grupos, houve um aumento significativo nas concentrações séricas de nicotina imediatamente após o uso do produto. A captação de nicotina a partir de um e-cigarro foi semelhante a um cigarro convencional, com as concentrações máximas médias de nicotina atingindo 12,3 e 12,6 ng/mL respectivamente. Além disso, os resultados dos glóbulos brancos (GB) totais e suas subpopulações não revelaram diferenças significativas entre não fumantes, usuários de e-cigarros e fumantes (Tabela 2). De modo semelhante, não houve diferenças significativas entre os grupos de e-cigarro e de cigarro convencional antes e depois de fumar em relação à contagem média de plaquetas (PLT), embora a PLT a -1 h tenha sido significativamente menor (após ajuste para comparações múltiplas) nos grupos de usuários de e-cigarro e de fumantes em comparação a não fumantes.

EFEITOS AGUDOS DO USO DO PRODUTO DE TABACO NA ERO INTRACELULAR E FORMAÇÃO TUBULAR DE IPSC-ECS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SORO.

Para explorar como o uso de produtos de tabaco afeta a produção de ERO e a sinalização angiogênica *in vivo*, nós incubamos iPSC-ECs com soro derivado de não fumantes, usuários de e-cigarros e fumantes, como descrito no texto anterior. Nas amostras de -1 h coletadas após um período noturno de alimentos, álcool e tabaco, observamos ERO intracelular signifi-

TABELA 2 Contagens de sangue periférico e subpopulação de linfócitos em cinco não fumantes, quatro usuários de e-cigarro e cinco fumantes de cigarro convencional antes e depois da exposição à fumaça

	Não fumantes	Usuário e-cig		Fumantes cig	
		Antes	Depois	Antes	Depois
GB, k/ μ l	5,5 \pm 0,9	5,5 \pm 0,6	5,6 \pm 0,8	6,0 \pm 0,7	6,4 \pm 0,5
Linfócitos, %	33,7 \pm 0,7	35,7 \pm 4,7	33,7 \pm 3,9	31,0 \pm 3,9	26,1 \pm 2,5
Neutrófilos, %	54,9 \pm 0,5	51,7 \pm 4,6	54,5 \pm 3,9	59,5 \pm 3,2	63,2 \pm 2,3
Monócitos, %	6,2 \pm 0,4	6,2 \pm 0,6	6,5 \pm 0,3	6,6 \pm 0,6	6,2 \pm 0,7
Eosinófilos, %	3,1 \pm 0,5	3,4 \pm 0,6	2,7 \pm 0,7	3,0 \pm 0,7	2,4 \pm 0,8
Basófilos, %	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
GV, mil/ μ l	4,7 \pm 0,5	4,6 \pm 0,1	4,6 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1
HGB, g/dl	13,7 \pm 1,4	13,8 \pm 0,3	14,0 \pm 0,3	13,0 \pm 0,4	12,8 \pm 0,4
HCT, %	41,2 \pm 4,1	41,1 \pm 0,8	41,4 \pm 1,0	39,5 \pm 1,2	38,3 \pm 1,1
MCV, fl	87,2 \pm 1,8	89,9 \pm 2,3	90,7 \pm 2,1	91,9 \pm 1,3	91,4 \pm 1,2
PLT, k/ μ l	304,3 \pm 4,2	213,3 \pm 21,8*	208,5 \pm 25,1	206,8 \pm 17,0†	201,3 \pm 19,1

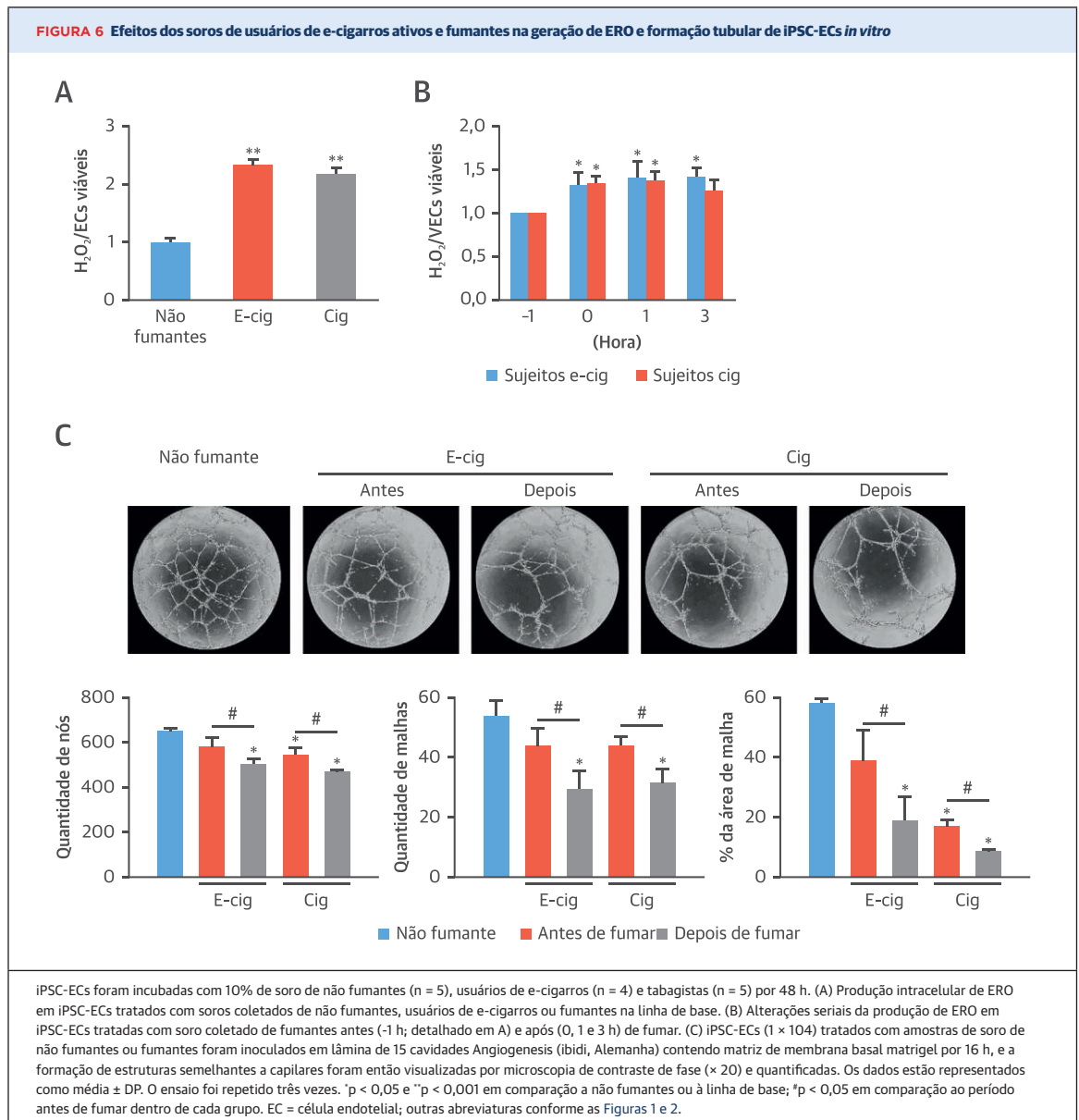
Os valores são média \pm DP. *, †Estatisticamente significante de não fumantes ($p < 0,05$ e $\dagger p < 0,001$).
HCT = hematócrito; HGB = hemoglobina; GV = glóbulos vermelhos; GB = glóbulo branco; MCV = volume médio de glóbulos vermelhos; PLT = plaquetas; outras abreviaturas conforme a Tabela 1.

cativamente maior nas células incubadas com soro de usuários de e-cigarros e fumantes em comparação a soro de não fumantes (Figura 6A), com aumento ainda maior pelo soro coletado imediatamente após (0 h) e 1 e 3 h após o uso de um único e-cigarro ou cigarro convencional (Figura 6B). O tratamento de iPSC-ECs com soro coletado antes e 3 h depois de fumar também revelou comprometimento da capacidade de formação tubular em comparação a controles tratados com soro de não fumantes (Figura 6C). Posteriormente, foram medidas 62 citocinas inflamatórias humanas no soro de usuários de e-cigarros e cigarros convencionais antes e depois de fumar (Tabela On-line 3). Níveis de IL-6, ICAM-1, fator estimulante de colônias de macrófagos e proteína quimiotática de monócitos-1 no soro de usuários de e-cigarro e fumantes depois de fumar foram significativamente maiores do que antes de fumar (Figura 7), mas perderam significância estatística após o ajuste para comparações múltiplas. Além disso, foi observada uma tendência de aumento dos níveis de todas as outras citocinas no soro de usuários de e-cigarros e fumantes depois de fumar em comparação aos níveis antes de fumar, e nenhum nível de citocina mostrou diferença significativa entre usuários de e-cigarros e fumantes.

ANÁLISE DE APRIMORAMENTO FUNCIONAL E DE GENES COM ADIÇÃO DE LÍQUIDOS DE E-CIGARRO.

Com base nos resultados de nossas experiências *in vitro*, depois investigamos os efeitos de dois e-líquidos com sabor no perfil transcriptômico de iPSC-ECs (número de acesso GEO: GSE125217). Escolhemos um e-líquido com alta citotoxicidade, Marcado (MAR) (concentração de 0,03%), e um com baixa citotoxicidade, RY4 (RY) (concentração de 0,3%), ambos com e sem nicotina. As concentrações ideais para cada sabor de e-líquido foram

estabelecidas a 80% de viabilidade celular de iPSC-EC após exposição de 24 h *in vitro*. Usando a análise de componentes principais (PC), observamos que o PC1 refletiu as diferenças entre iPSC-ECs derivadas de dois indivíduos diferentes (Figura On-line 4A), enquanto o PC2 identificou clusters distintos correspondentes a amostras tratadas com MAR de amostras tratadas com RY, e o PC3 separou ainda mais as amostras tratadas com RY18 das amostras tratadas com RY0 ou de controle (Figura On-line 4B). Coletivamente, esses dados demonstram que tanto o tratamento MAR0 quanto MAR18 afetam marcadamente o transcriptoma de iPSC-ECs, enquanto o tratamento RY tem pouca influência na concentração de nicotina. A análise da ontologia genética (OG) usando uma taxa de detecção falso positiva $< 0,05$ identificou um total de 104 genes expressos diferencialmente (GEDs) (incluindo 64 GEDs com regulação ascendente e 40 GEDs com regulação descendente) em iPSC-ECs após exposição a MAR0 ou MAR18 em comparação aos sujeitos controle (Figura On-line 5A, Tabela On-line 4). A análise de aprimoramento de GO revelou que os perfis de expressão mais preservados entre amostras tratadas com MAR e controle estavam relacionados ao processo de oxidação-redução, organização da matriz extracelular e resposta a substâncias tóxicas (Figuras On-line 5B e 5C). Um diagrama de cordas para as cinco vias sobrerrepresentadas ($p < 0,05$) incluiu a expressão diferencial de genes envolvidos em resposta a substâncias tóxicas, vesículas ligadas à membrana, ligação ao fator de crescimento, processo biossintético de pentose e processo de redução da oxidação (Figura On-line 5D). Curiosamente, quando comparamos a expressão diferencial de genes em iPSC-ECs expostos a MAR0 ou MAR18, não foi detectado nenhum cluster de anotação aprimorado significativo (dados não mostrados).

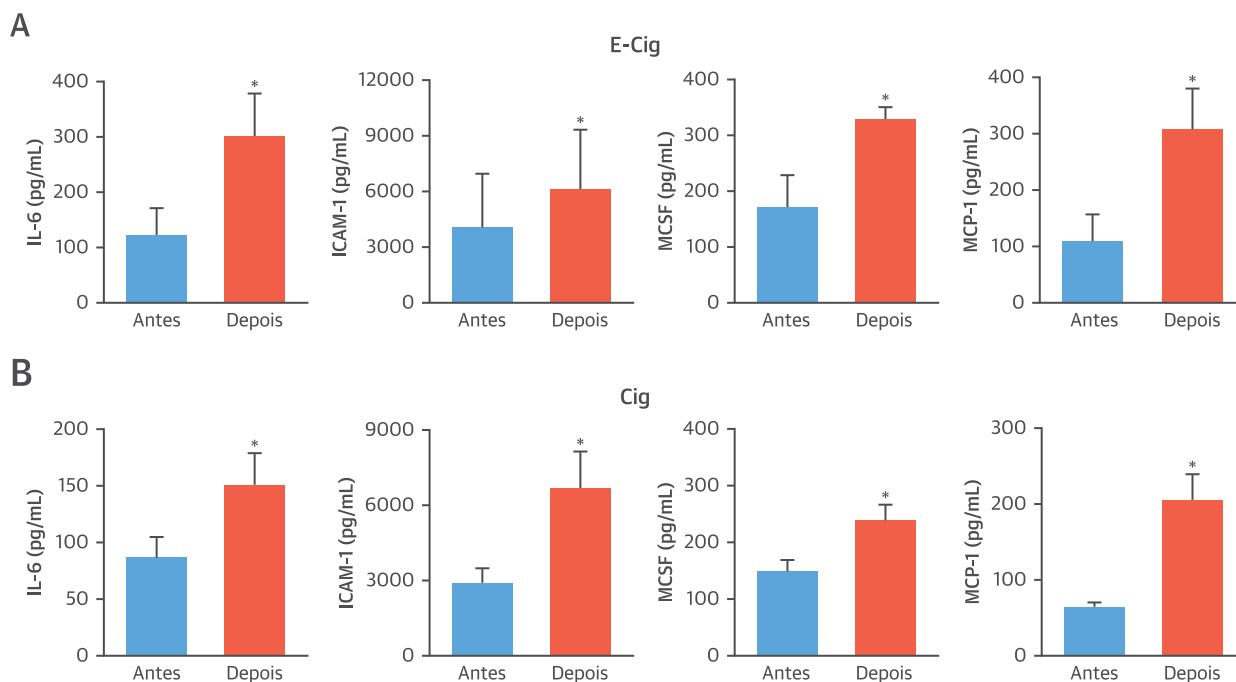


DISCUSSÃO

Compreender os efeitos para a saúde de e-líquidos, especialmente os aromatizantes, é importante para estabelecer a segurança dos e-cigarros a curto e longo prazo. Neste estudo, comparamos os efeitos biológicos de e-líquidos com sabor (com e sem nicotina) em iPSC-ECs e descobrimos que alguns aromatizantes tinham efeitos tóxicos sobre a viabilidade e função de células endoteliais (Ilustração Central). O produto com sabor de canela (Marcado) foi a amostra mais tóxica testada, produzindo forte citotoxicidade em iPSC-ECs, o que levou à diminuição da sobrevivência celular, a respostas angiogênicas comprometidas e ao aumento dos

níveis de ERO e atividade da caspase 3/7. Nossos achados correspondem aos resultados de estudos recentes que mostram que e-líquidos e aerossóis com sabor de canela são altamente voláteis, citotóxicos e genotóxicos para células embrionárias humanas e células pulmonares de adultos (8,18). Notadamente, nossos resultados mostraram que os efeitos de aromatizantes de e-líquidos em fenótipos e funções endoteliais, incluindo citotoxicidade, nível de ERO, atividade de caspase 3/7, propriedades pró-angiogênicas e migração, eram mais fortes do que os da concentração de nicotina. Também observamos efeitos biológicos semelhantes a aromatizantes de e-líquidos em iPSC-ECs em um aprimoramento de um conjunto de genes e em análises de aprimoramento de

FIGURA 7 Níveis séricos de citocinas em usuários de e-cigarros ativos e fumantes obtidos antes e depois de fumar



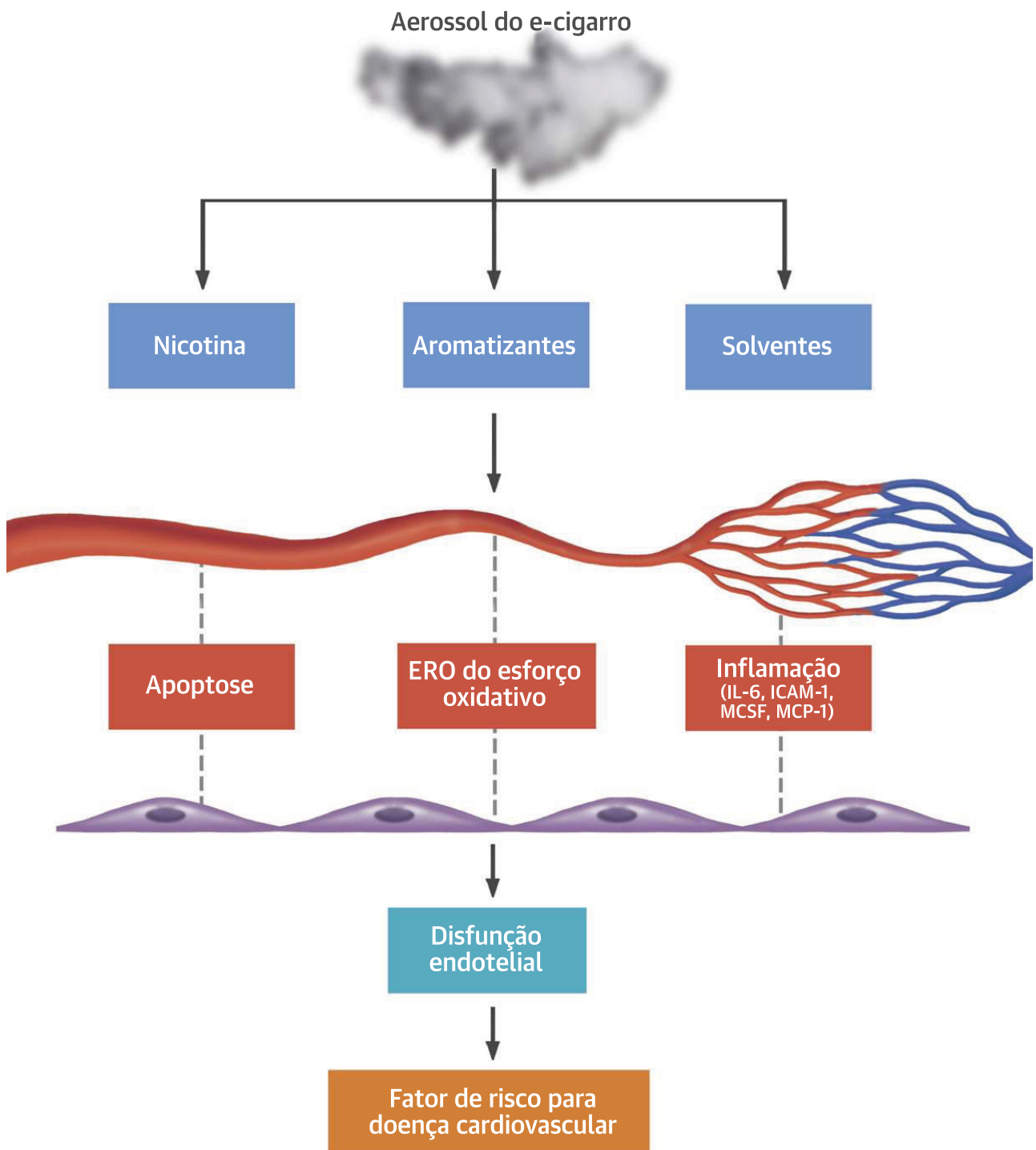
Concentração de IL-6, ICAM-1, MCSF e MCP-1 no soro de quatro usuários de e-cigarro (A) ou cinco fumantes (B) foram comparados antes (Antes) e 3 h depois de fumar (Depois). Os dados estão representados como média ± EPM. *p < 0,05 em comparação a antes de fumar. ICAM = molécula de adesão intracelular; IL = interleucina; MCP = proteína quimioatratante de monócito; MCSF = fator estimulador de colônias de macrófagos.

OG. Identificamos alterações na expressão de genes envolvidos em múltiplas funções biológicas, incluindo resposta a substâncias tóxicas, vesícula ligada à membrana, ligação ao fator de crescimento, processo biossintético de pentose e processo de redução da oxidação 24 h pós-exposição ao sabor do e-líquido Marcado com ou sem nicotina. Algumas dessas categorias funcionais aprimoradas do nosso estudo também foram destacadas em estudos relatados anteriormente em um sistema celular tridimensional primário de vias aéreas e pulmões de camundongos expostos a aerossóis de e-cigarro ou cigarro convencional respectivamente (19,20).

A nicotina, um dos principais constituintes ativos na maioria dos produtos para fumar, é metabolizada em cotinina principalmente pelo fígado (21). Embora tenha sido relatado que a taxa de absorção de nicotina e os níveis de nicotina no plasma são inferiores no uso de e-cigarros em comparação ao cigarro convencional, ele ainda pode atingir um nível tardio, mas comparável a um cigarro de tabaco (21). Como tragadas intensas (ou seja, mais tragadas e maior volume por tragada) podem influenciar o fornecimento de nicotina, aplicamos um estudo semelhante para usuários de e-cigarros e fumantes (uma tragada de 2 s a cada 30 s por 10 min).

Descobrimos que o efeito do uso de e-cigarros sobre os níveis médios de nicotina no plasma foi semelhante a fumar um cigarro de tabaco. O pico de concentração de nicotina no plasma para usuários de e-cigarros e cigarros convencionais foi observado imediatamente depois de fumar, o que é consistente com relatos anteriores (21,22), indicando que os e-cigarros fornecem nicotina por meio de rápida absorção pulmonar.

Embora estudos com cigarros convencionais tenham mostrado que a exposição aguda e prolongada ao tabagismo aumenta o risco de DCV por meio de aumento do estresse oxidativo (9,23), inflamação (9), disfunção endotelial (9,10) e pressão arterial elevada (24), os estudos sobre os efeitos da nicotina e dos sabores dos líquidos do e-cigarro têm sido ainda limitados. No presente estudo, observamos que marcadores pró-inflamatórios como IL-6, ICAM-1, fator estimulante de colônias de macrófagos e proteína-1 quimiotática de monócitos estavam elevados no soro de usuários de e-cigarros e cigarros convencionais 3 h após o uso em comparação ao soro coletado antes de fumar, enfatizando o perigo de exposição em curto prazo ao aerossol de e-cigarro *in vivo*. Esses marcadores inflamatórios são conhecidos por desempenharem um papel crítico na patogênese da doença vascular.

ILUSTRAÇÃO CENTRAL Células endoteliais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos para avaliação de risco de e-cigarro

Lee, W.H. et al. J Am Coll Cardiol. 2019;73(21):2722-37.

Visão geral mecanicista na qual o uso de e-cigarro poder causar disfunção endotelial aguda. A exposição de células endoteliais a aromatizantes de e-cigarros ou soro de usuários de e-cigarros leva à disfunção endotelial associada ao aumento da apoptose, espécies reativas de oxigênio e inflamação. ERO = espécie reativa de oxigênio; ICAM = molécula de adesão intracelular; IL = interleucina; MCP = proteína quimioatraente de monócito; MCSF = fator estimulante de colônias de macrófagos.

Também demonstramos que o soro de usuários de e-cigarros e cigarros expressou EROs basais elevados em comparação a não fumantes, o que pode estar ligado a mediadores inflamatórios ativados. Os níveis basais de ERO já elevados no soro dos usuários de e-cigarros aumentaram rapidamente depois de fumar. As evidências acumuladas sugerem que as EROs desempenham um papel importante na angiogênese fisiológica e patológica (9,25). Neste estudo, descobrimos que os meios condicionados de iPSC-ECs com exposição ao tratamento de e-líquido promoveu a polarização dos macrófagos M1 e M2, com uma maior tendência de polarização M1. Esses macrófagos polarizados M1 podem ser, em parte, responsáveis por fortes perfis pró-inflamatórios, os quais estão ligados ao aumento da geração de EROs. Isso é consistente com estudos prévios que demonstram que os macrófagos produzem altos níveis de ERO, o que também atua em um fenótipo de macrófagos reguladores de alça de retroalimentação (25,26). No entanto, ainda é preciso se investigar mais o papel exato da ERO na ativação de macrófagos. É importante ressaltar que nossos dados corroboraram a validação da presença de ERO no soro dos usuários de e-cigarros depois que o uso de e-líquidos com sabor foi associado à disfunção das células endoteliais, como mostrado pela formação tubular alterada em iPSC-ECs. Consistente com este achado, Carnevale et al. (23) observaram efeitos negativos nos marcadores de estresse oxidativo (isto é, peptídeo solúvel derivado de NOX2 e 8-iso-prostaglandina F2 α) e dilatação mediada por fluxo após um único uso de e-cigarro, fazendo surgir preocupações quanto à segurança vascular dos e-cigarros. Os resultados desses estudos corroboram ainda mais os efeitos prejudiciais do uso de e-cigarros e do tabagismo no aumento do estresse oxidativo e da disfunção endotelial.

Por fim, foi realizada uma caracterização das respostas leucocitárias em fumantes, uma vez que tem sido relatado que o tabagismo agudo e crônico vem acompanhado de uma elevação transitória da contagem de leucócitos, o que é considerado um fator de risco cardiovascular bem estabelecido em estudos epidemiológicos (27). Em nosso estudo, não houve diferenças estatisticamente significativas nas contagens globais de leucócitos ou subpopulatórias entre não fumantes e fumantes de e-cigarros ou de cigarros convencionais, o que é consistente com um estudo anterior (28). No entanto, encontramos uma contagem de PLT significativamente menor em fumantes em comparação a não fumantes, o que pode ocorrer devido à diminuição da atividade trombopoietica induzida pela nicotina, comumente observada em fumantes crônicos (29). Independentemente dos mecanismos subjacentes, essas alterações são indi-

cações importantes de como o uso do e-cigarro pode comprometer a imunidade do hospedeiro.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO. Apesar de ter muitos pontos fortes, nosso estudo tem várias limitações. Em primeiro lugar, como estávamos interessados em avaliar os efeitos diretos desses líquidos na saúde vascular, os resultados de nossa avaliação *in vitro* do aromatizante de e-líquido usando iPSC-ECs foram restritos a e-líquidos e não a aerossóis, uma vez não havia aquecimento ou combustão envolvidos. Contudo, adicionamos soro de usuários de e-cigarros em meios de cultura de iPSC-ECs para simular a exposição celular ao aerossol de e-cigarro que ocorre *in vivo*, incluindo a exposição a substâncias tóxicas que sofreram ativação ou desativação metabólica. A presença ou ausência de aerossóis pode explicar a diferença observada nos efeitos da nicotina: a nicotina presente nos e-líquidos parece ter apenas um pequeno efeito na produção de ERO e nenhum efeito na formação tubular, enquanto o soro coletado de usuários de e-cigarros e fumantes, que contém níveis maiores de nicotina, aumentou significativamente a produção de ERO e prejudicou a formação tubular. Esses efeitos podem ocorrer devido à falta de combustão usada em ambientes *in vitro*, o que poderia tornar os e-cigarros potencialmente mais tóxicos em comparação ao soro coletado de usuários de e-cigarros e fumantes que envolvem combustão. Outro fator que pode contribuir para as respostas diferenciais é o aumento da complexidade molecular do soro coletado de pacientes devido aos efeitos sistêmicos de outros tipos de células além das células endoteliais que podem ser afetadas por e-cigarros ou cigarros. Mais estudos que explorem os químicos tóxicos nos e-líquidos, e-cigarros aerossóis e soro em relação à função e citotoxicidade endotelial são necessários para entender melhor o risco potencial de compostos tóxicos gerados pelos produtos de e-cigarro. Em segundo lugar, o protocolo fixo de tragadas usado em nosso estudo em um ambiente experimental pode não refletir a prática real de tragadas do usuário. No entanto, esse protocolo fixo foi necessário para permitir que comparássemos diretamente os resultados de forma padronizada entre diferentes sujeitos em estudos separados. É importante notar que nossos resultados com base em seis sabores selecionados podem não ser universalmente aplicáveis a todos os e-cigarros, dada a grande variedade de e-líquidos no mercado, cuja composição pode variar conforme a marca. Em terceiro lugar, o volume relativamente pequeno e o tamanho amostral dos soros disponíveis impossibilitaram a realização de ensaios adicionais, e uma coleta adicional de amostras pode ser necessária para extrapolar os achados de nosso estudo para a população geral de usuários de e-cigarros.

CONCLUSÕES

Nossos dados demonstraram que os aromatizantes de e-líquidos selecionados têm efeitos prejudiciais na viabilidade e função das células endoteliais, alterações as quais são acompanhadas por aumento da atividade de ERO e caspase 3/7. Também mostramos que o uso de e-cigarros por si só é capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de nicotina comparáveis aos níveis alcançados com cigarros convencionais, indicando que os e-cigarros fornecem uma entrega eficaz e mensurável de nicotina. Além disso, nossos resultados mostram uma maior geração de ERO, e citocinas inflamatórias presentes no soro foram observadas em conjunto com a disfunção endotelial induzida pelo uso agudo de e-cigarros, como indicado pela formação tubular comprometida de iPSC-ECs. À medida que o uso de e-cigarros se torna mais difundido, estudos sobre seus efeitos sobre a saúde se tornam mais urgentes, uma vez que sua compreensão poderia trazer mais informações às políticas e regulamentações de saúde pública. No entanto, nossos achados atuais são um primeiro passo importante para preencher essa lacuna, fornecendo insights mecanicistas sobre como os e-cigarros causam lesões e

disfunções endoteliais, as quais são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de DCV.

CORRESPONDÊNCIA. Dr. Joseph C. Wu, 265 Campus Drive, G1120B, Stanford, California 94305-5344, EUA. E-mail: joewu@stanford.edu. Twitter: @StanfordCVI. OU Dr. Won Hee Lee, 425 North 5th Street, Room 426, Phoenix, Arizona 85004-2157, EUA. E-mail: whlee@email.arizona.edu.

PERSPECTIVAS

COMPETÊNCIA EM CONHECIMENTO MÉDICO.

As iPSC-ECs por humanos expostas aos compostos no líquido de e-cigarro ou no soro de usuários de e-cigarros desenvolvem disfunção endotelial associada à viabilidade diminuída, acúmulo de ERO e propriedades proangiogênicas comprometidas.

PANORAMA TRANSLACIONAL. Como a disfunção endotelial frequentemente precede as manifestações clínicas da doença, são necessários estudos clínicos para examinar os efeitos em longo prazo dos e-cigarros nos desfechos cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2014.
- U.S. Department of Health and Human Services. E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2016.
- Arrazola RA, Singh T, Corey CG, et al. Tobacco use among middle and high school students - United States, 2011-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64:381-5.
- Zhu SH, Sun JY, Bonnevie E, et al. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control* 2014;23 Suppl 3:iii3-9.
- Scott G. Proposed new steps to protect youth by preventing access to flavored tobacco products and banning menthol in cigarettes. FDA Statement November 2018. Available at: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/UCM625884.htm>. Accessed April 9, 2019.
- Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, et al. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control* 2014;23:133-9.
- Grana R, Benowitz N, Glantz SA. E-cigarettes: a scientific review. *Circulation* 2014;129: 1972-86.
- Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang YH, Talbot P. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol* 2012;34:529-37.
- Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:509-15.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-55.
- Fetterman JL, Weisbrod RM, Feng B, et al. Flavorings in tobacco products induce endothelial cell dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38:1607-15.
- Kodo K, Ong SG, Jahanbani F, et al. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF-beta signalling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *Nat Cell Biol* 2016;18:1031-42.
- Coleman B, Rostron B, Johnson SE, et al. Transitions in electronic cigarette use among adults in the Population Assessment of Tobacco and Health (PATH) Study, Waves 1 and 2 (2013- 2015). *Tob Control* 2019;28:50-9.
- Delnevo CD, Giovenco DP, Steinberg MB, et al. Patterns of electronic cigarette use among adults in the United States. *Nicotine Tob Res* 2016;18: 715-9.
- Schnabel R, Blankenberg S. Oxidative stress in cardiovascular disease: successful translation from bench to bedside? *Circulation* 2007;116:1338-40.
- Ghosh A, Gao L, Thakur A, Siu PM, Lai CWK. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci* 2017;24:50.
- Kim F, Tysseling KA, Rice J, et al. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:989-94.
- Behar RZ, Luo W, Lin SC, et al. Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols. *Tob Control* 2016;25:ii94-102.
- Miller MA, Danhorn T, Cruickshank-Quinn CI, et al. Gene and metabolite time-course response to cigarette smoking in mouse lung and plasma. *PLoS One* 2017;12:e0178281.
- Haswell LE, Baxter A, Banerjee A, et al. Reduced biological effect of e-cigarette aerosol compared to cigarette smoke evaluated in vitro using normalized nicotine dose and RNA-seq based toxicogenomics. *Sci Rep* 2017;7:888.
- Marsot A, Simon N. Nicotine and cotinine levels with electronic cigarette: a review. *Int J Toxicol* 2016;35:179-85.
- Dawkins L, Corcoran O. Acute electronic cigarette use: nicotine delivery and subjective effects in regular users. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231:401-7.
- Carnevale R, Sciarretta S, Violi F, et al. Acute impact of tobacco vs electronic cigarette smoking on oxidative stress and vascular function. *Chest* 2016;150:606-12.
- Nakamura K, Barzi F, Lam TH, et al. Cigarette smoking, systolic

blood pressure, and cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Stroke* 2008;39:1694-702.

25. Tan HY, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:2795090.

26. He C, Carter AB. The metabolic prospective and redox regulation of macrophage polarization. *J Clin Cell Immunol* 2015;6:371.

27. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG,

Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2005;26:1765-73.

28. Lympiraki E, Makedou K, Iliadis S, Vagdatli E. Effects of acute cigarette smoking on total blood count and markers of oxidative stress in active and passive smokers. *Hippokratia* 2015;19:293-7.

29. Nair S, Kulkarni S, Camoens HM, Ghosh K, Mohanty D. Changes in platelet glycoprotein

receptors after smoking—a flow cytometric study. *Platelets* 2001;12:20-6.

PALAVRAS-CHAVE aerossol de e-cigarro, aromatizante de e-líquido, disfunção endotelial, iPSC-ECs

APÊNDICE Para acesso a uma seção de Métodos expandida, figuras suplementares e tabelas, confira a versão *on-line* deste artigo.