



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

Ana Carla Lorenz Vieira

**OS EFEITOS DOS CONSTITUINTES DO CIGARRO ELETRÔNICO NO
COMPORTAMENTO DOS OSTEÓBLASTOS**

Florianópolis - SC
2022

Ana Carla Lorenz Vieira

**OS EFEITOS DOS CONSTITUINTES DO CIGARRO ELETRÔNICO NO
COMPORTAMENTO DOS OSTEÓBLASTOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Odontologia na área de Concentração do Programa de Implantodontia.

Orientador(a): Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti

Coorientador: Prof. Dr. Mahmoud Rouabhia

Florianópolis - SC

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lorenz-Vieira, Ana Carla

Os Efeitos dos Constituintes do Cigarro Eletrônico no
Comportamento dos Osteoblastos / Ana Carla Lorenz-Vieira ;
orientador, Cesar Augusto Magalhães Benfatti,
coorientador, Mahmoud Rouabhia, 2022.

45 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Cigarro Eletrônico. 3. Osteoblasto.
4. Crescimento celular. 5. Adesão celular. I. Magalhães
Benfatti, Cesar Augusto. II. Rouabhia, Mahmoud. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Odontologia. IV. Título.

Ana Carla Lorenz Vieira

Os Efeitos dos Constituintes do Cigarro Eletrônico no Comportamento dos Osteoblastos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 21 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ana Luiza de Lima Curi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Mariane Beatriz Sordi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Gabriel Leonardo Magrin (Suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Odontologia, área de concentração em Implantodontia, pelo Programa de Pós-Graduação.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.^a Dr.^a Mariane Cardoso Carvalho
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti
Orientador

Florianópolis, 2022.

Esse trabalho é dedicado ao meu filho *Antonio*, que ressignificou a minha vida, e ao meu marido *Arthur* pela parceria e suporte nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois através dEle tenho trilhado grandes caminhos em minha vida. Graças à Ele pude nascer numa família que me incentivou e me deu todo o suporte para que eu fosse ao mundo buscar novas conquistas. Além de pessoas incríveis, como amigos, mestres e colegas que me motivam a buscar sempre minha melhor versão.

Agradeço imensamente aos meus pais **Carlos** (in *memoriam*) e **Ana**, pelo amor e companheirismo, por caminhar lado a lado e proporcionarem aos filhos a busca dos seus sonhos. Mãe, obrigada por ser essa mulher guerreira, que eu admiro e me espelho. A vocês meu amor eterno.

O meu muito obrigada a minha pessoa favorita, ao parceiro da minha vida, **Arthur**, quem tive a sorte de encontrar há muitos anos, e tenho o privilégio de compartilhar a vida. Obrigada por me incentivar como mulher e como profissional, por ter as palavras certas nos momentos que tudo parece errado, e por toda a dedicação a nossa família. Tu me enches de orgulho, te admiro como homem e como profissional, tu me motivas a evoluir cada dia mais.

Ao meu filho **Antonio**, que me ensinou que sair da zona de conforto é o que nos impulsiona a aprender e a crescer, e que me ensina o real significado do amor incondicional todos os dias.

A minha amiga e comadre **Camila Grock**, a quem me espelhei para buscar esse título de mestre. Obrigada pela escuta, pelas dicas cheias de carinho, e pelas verdades sempre tão diretas. Tu sabes o quanto te admiro, tua dedicação com a profissão e com todos ao teu redor me inspiram. Saudades minha amiga.

Aos amigos que fiz durante a pós-graduação, **Guilherme, Lucas Anjos, Nicole Lonni, Thales** e **Lucas**. Obrigada pela parceria, por compartilharem conhecimento. Nem todos tive o prazer de conhecer pessoalmente, devido à pandemia, mas que fizeram toda a diferença para que esses 2 anos fossem mais leves e mais produtivos. Foi um prazer “conviver” com vocês.

Às mestres/doutoras, **Roberta Michels, Karin Koiyama** e **Mari Sordi**, vocês foram de extrema importância durante o mestrado, foram o Norte nesse percurso, e que me brindaram com sua amizade. Obrigada por compartilharem o conhecimento de vocês comigo, pelas explicações de maneira tranquila e de forma clara, e pela colaboração para a conclusão desse trabalho.

Ao meu orientador **Cesar Benfatti**, obrigada por me acompanhar nesses dois anos de pós-graduação e por confiar em mim, permitindo que eu saísse de perto dos teus olhos e fosse capaz de realizar a pesquisa no Canadá. Obrigada pelas reuniões, por dividir seu conhecimento e sua experiência comigo. Obrigada por tranquilizar mostrando empatia quando sentia que o estresse estava me tirando dos trilhos.

Ao meu coorientador **Dr. Mahmoud Rouabhia** por ter me aceitado em seu laboratório e me introduzir à pesquisa científica. Obrigada pela disponibilidade e dedicação com esse trabalho, e por confiar no meu trabalho. Com o senhor aprendi a entender o real sentido da curva de aprendizado e a confiar no processo. Assim como agradeço ao Laboratório de pesquisa do **GREB** (Groupe de Recherche em Écologie Bucalle) e à **Université Laval** do Canadá, pelas portas abertas e por todo o suporte para a realização da pesquisa do mestrado. Agradeço também aos alunos do laboratório **Athieh, Xavier, Neftha** pelos ensinamentos e todo o auxílio durante minha estadia.

Ao professor **Marco Aurélio Bianchini** pelas oportunidades de ministrar aulas para a graduação. E aos demais professores do CEPID, **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, Profa. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz e Profa. Dra. Cláudia Ângela Maziero Volpato** pelas aulas ministradas cheias de ensinamentos.

Aos **colegas que fazem parte da família CEPID**, obrigada pelo acolhimento, foram poucos momentos de convívio, mas senti o quão especiais e competentes vocês são, tenho orgulho de ter feito parte disso.

Agradeço a **Profa Dra. Daniela Carcereri** por me confiar e orientar em um projeto de pesquisa apresentado ao SBPqO. Agradeço a sua parceria durante à realização da pesquisa, e também pelas palavras de incentivo.

À **Universidade Federal de Santa Catarina** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO)** pela oportunidade de realizar o mestrado nesse lugar de grande valor, o qual me orgulho muito de ter feito parte da minha trajetória.

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez 100 vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes”.

(Jacob Riis, 1849-1914)

RESUMO

Os cigarros eletrônicos foram desenvolvidos como um substituto aos efeitos deletérios do cigarro convencional, tornando-se extremamente popular entre os jovens. Entretanto, o aerossol produzido pelo cigarro eletrônico entra em contato com diferentes componentes da cavidade oral, prejudicando mucosa e tecido ósseo. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos dos constituintes líquido do cigarro eletrônico (e-líquido) na morfologia, adesão, proliferação e citotoxicidade dos osteoblastos. A linhagem celular de osteoblastos humanos (MG-63) foram expostas à quatro condições contendo o e-líquido na apresentação de propileno glicol (PG) a 70% e glicerina vegetal (VG) a 30% com e sem aromatizante, e em duas concentrações de nicotina de 12 e 18 mg/mL. Os e-líquidos foram utilizados em concentrações de 0%, 1% ou 5%. Após 24 h de exposição, a viabilidade celular foi avaliada através de análise de morfologia celular e adesão celular (Azul de Tripam), assim como análise da proliferação celular, através de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) do método de redução do sal de tetrazólio (ensaio de MTT). Os níveis de LDH (Lactato Desidrogenase) foram mensurados para testar a citotoxicidade do e-líquido. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando os testes ANOVA, e teste Tukey e Bonferroni para múltiplas comparações. A viabilidade e morfologia celular foram significativamente alteradas de maneira dose-dependente. Morfologicamente, as células, transformaram-se de uma forma alongada a um formato arredondado com rompimento do seu citoplasma. A adesão celular diminuiu conforme aumento da concentração do e-líquido, assim como aumento da concentração de nicotina presente no e-líquido (18 mg/mL). Os resultados foram confirmados pela diminuição da proliferação dos osteoblastos e, conseqüentemente, um aumento na morte celular, confirmando os efeitos tóxicos dos e-líquidos sobre os osteoblastos. Considerando as limitações desse estudo, esse estudo aponta os potenciais efeitos nocivos dos cigarros eletrônicos nas células ósseas que podem levar ao comprometimento dos processos de regeneração e remodelação óssea.

Palavras-chave: Cigarro Eletrônico; Osteoblasto; Crescimento celular; Adesão celular; In Vitro; LDH.

RESUMO EXPANDIDO

Introdução

O tabagismo e sua relação com doenças periodontais, falha de implantes dentários (CHRCANOVIC; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2015; JAVED; RAHMAN; ROMANOS, 2019), assim como sendo uma causa de deficiências ósseas, sendo considerado fator de risco para osteoporose, está bem evidenciado na literatura (BETHESDA, 2018; CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION., 2018). Embora medidas de combate à epidemia do tabaco tenham surtido efeito na redução do tabagismo, outros dispositivos para fumar surgiram em paralelo. Os cigarros eletrônicos foram inicialmente comercializados como auxílio à cessação do vício, porém se tornou extremamente popular entre os jovens, que em muitos casos, não haviam experimentado o cigarro convencional. Os dispositivos eletrônicos para fumar (DEFs), como são conhecidos no Brasil, foram patenteados em 2003. Em geral, são compostos por uma bateria e um reservatório onde é dispensado o líquido do cigarro eletrônico (e-líquido). Esse ao ser aquecido por um dispositivo elétrico, se transforma em aerossol e dessa forma é inalado. Usuários relatam que utilizam os cigarros eletrônicos como alternativa aos cigarros tradicionais e acreditam que são dispositivos menos prejudiciais, que causam menos efeitos danosos aos fumantes passivos (CTADS). Porém, revisões de literatura que analisaram os efeitos dos DEFs têm relatado seu impacto na saúde oral demonstrando que esses dispositivos não podem ser considerados inofensivos (JAVED; RAHMAN; ROMANOS, 2019; ROUABHIA, 2020) devido aos diversos constituintes presentes no e-líquido (ROUABHIA *et al.*, 2017, 2019; WAVREIL; HEGGLAND, 2020). O e-líquido contém umectantes como o propileno glicol (PG) e a glicerina vegetal (VG), aromatizantes, podendo conter ou não nicotina. A nicotina é um potente estimulante do sistema nervoso central, que ao ser inalada atinge níveis altos no cérebro em poucos segundos, o que faz com que o tabagismo seja a maior via de dependência de nicotina (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; GRANA; BENOWITZ; GLANTZ, 2014). Essa substância demonstrou influenciar de maneira negativa um mediador crítico do fator de transcrição relacionado ao fenótipo do osteoblasto (RUNX2) (OTERO *et al.*, 2019). Além da nicotina, os aromatizantes foram identificados como capazes de danificar o funcionamento dos osteoblastos, como por exemplo sua proliferação e diferenciação. Uma vez que a cavidade oral é o primeiro local a entrar em contato com o aerossol gerado pelo cigarro eletrônico, diferentes estruturas podem ser alteradas, como superfícies dentárias, mucosa e tecido ósseo. Evidências têm reportado o favorecimento de infecções oportunistas como candidíase oral e facilidade à adesão de bactérias como *Streptococcus mutans* promovendo a formação do biofilme (KIM *et al.*, 2018; ROUABHIA; SEMLALI, 2021). Também há relatos como danos aos tecidos epiteliais, e alterações nas células do tecido ósseo. Devido à ausência de padronização dos constituintes líquidos do cigarro eletrônico, os dados reportados na literatura ainda são escassos e inconclusivos para afirmar que danos ao tecido ósseo se comparem àqueles causados pelo cigarro convencional.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos constituintes líquidos do cigarro eletrônico na morfologia, adesão, e na proliferação dos osteoblastos, assim como a análise dos níveis de liberação da lactato de desidrogenase (LDH). Avaliou-se os

efeitos dos diferentes e-líquidos contendo ou não aromatizantes, em presença ou não de nicotina.

Metodologia

Esta pesquisa *in vitro* foi desenvolvida em parceria com a Universidade Laval (Cidade de Québec, QC, Canada).

Cultura Celular:

A linhagem celular do tipo osteoblastos derivados de osteossarcoma humano (MG-63) foi utilizada neste estudo. As células foram cultivadas em meio osteogênico (TAZI *et al.*, 2012) contendo meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e meio HAM-F12 (H) suplementado com 24.3 µg/mL de adenina, 10 µg/mL fator de crescimento da epiderme, 0.4 µg/mL de hidrocortisona, 5 µg/mL insulina bovina, 5 µg/mL de transferrina humana, 2×10^{-9} M 3, 3', 5' triiodo-L-tironina, 100 µg/mL penicilina, 25 µg/mL gentamicina e 10% soro fetal bovino. As células foram incubadas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C até alcançarem uma confluência de 80-90%.

Preparo das Substância-Teste:

As substancias-teste, chamadas de e-líquido, foram escolhidas conforme disponibilidade para os usuários. Os e-líquidos foram adquiridos de revendedores locais (Cidade de Québec, QC, Canadá). Os quatro grupos de e-líquido foram:

- Grupo 1 (G1) - 70% PG/30% VG;
- Grupo 2 (G2) - 70% PG/30% VG e aromatizante;
- Grupo 3 (G3) - 70% PG/30% VG + aromatizante + nicotina à 12 mg/mL;
- Grupo 4 (G4) - 70% PG/30% VG + aromatizante + nicotina à 18 mg/mL.

O aromatizante testado nesse estudo foi o aroma de tabaco (Smooth Canadian Tobacco). As soluções foram preparadas diluindo as substancias-teste no meio de cultura, sendo analisados, portanto três concentrações, 0%, 1% e 5%. A solução descrita como concentração 0% foi utilizada como controle, composta pelo meio de cultura osteogênico apenas.

Avaliação dos efeitos dos e-líquidos na morfologia e adesão dos osteoblastos:

As células foram cultivadas na densidade de 2×10^5 células/poço em placa de 6 poços e cada poço foi suplementado com o e-líquido a ser estudado nas diferentes concentrações (0%, 1% e 5%), com volume total de 2 mL por poço. As células foram expostas diretamente as quatro substancias-teste descritas acima, e incubadas por um período de 24h em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Utilizou-se um microscópio invertido para análise qualitativa, e cada condição foi fotografada através de uma câmera digital. Para análise quantitativa foi utilizada a solução Azul de Tripam para a contagem de células viáveis através de um hemacitômetro em um microscópio invertido. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes.

Avaliação dos efeitos dos e-líquidos na proliferação dos osteoblastos:

Os osteoblastos foram semeados na densidade de 2×10^5 células/poço, em placa de 12 poços cultivados com 1 mL de meio de cultura, e incubados por 48 h em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C antes de serem expostos aos e-líquidos. Após atingirem confluência de 80-90%, o meio de cultura foi trocado e cada cultura recebeu o suplemento com o e-líquido nas concentrações de 0%, 1% e 5% para cada grupo a avaliado (G1, G2, G3 e G4). As células foram novamente incubadas em estufa

úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h. Através do ensaio de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi possível avaliar a viabilidade e proliferação celular. Após incubação, o sobrenadante foi removido, e a cultura foi irrigada com PBS, e então 500 µL de 0.04 M HCl em isopropanol foi adicionado em cada poço e incubado à temperatura ambiente, sob agitação por 15 minutos protegidas da luz. Após esse período, 120 µL da solução reagente foi transferida em quadruplicata para uma placa de 96 poços, para leitura em espectrofotômetro a 550 nm.

Avaliação dos efeitos dos e-líquidos na atividade da lactato desidrogenase (LDH) nos osteoblastos:

Os osteoblastos foram cultivados na densidade de 2×10^5 células/poço em placa de 6 poços, sendo o experimento realizado sempre em duplicata para cada solução de e-líquido testada, nas concentrações de 0%, 1% e 5%. As células foram expostas ao e-líquido e incubadas por 24 h em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Ao final do período de incubação, o meio de cultura foi coletado e usado para mensuração da liberação do lactato de desidrogenase (LDH) afim de avaliar a citotoxicidade celular. Foi coletado 50 µL do sobrenadante e transferido à uma placa de 96 poços de fundo plano, e então cada poço foi suplementado com 50 µL de uma mistura de substrato reconstituída. As placas foram protegidas da luz e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Para interromper a reação foi utilizado 50 µL de uma solução ácida adicionado em cada poço. A seguir, 100 µL de cada solução foi transferida em quadruplicata para uma nova placa de 96 poços de fundo plano para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. O experimento foi repetido pelo menos 3 vezes independentemente, em duplicata.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS versão 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística. Os dados foram analisados comparando as diferenças entre as substâncias-teste em suas diferentes concentrações. O teste One-way ANOVA foi usado para determinar as significâncias estatísticas entre os valores de distribuição normal. Para os dados com distribuição não normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Após a análise de post hoc, o p-valor foi ajustado pelo método de Tukey e de Bonferroni para as comparações entre os grupos.

Resultados e Discussão

Após exposição por 24 h ao líquido contendo apenas os componentes de 70% PG-30% VG, as células demonstraram mudança no seu formato e adesão celular reduzida quando em altas concentrações (5%) desse e-líquido. Com relação à sua morfologia o dano celular pode ser descrito pela forma mais arredondada sem nenhum contato celular entre si, quando comparado ao controle. Tais observações foram confirmadas quantitativamente através da avaliação da viabilidade celular através da contagem celular utilizando o azul de tripam. Foi encontrado uma redução significativa de células viáveis ($p < 0.001$). O número de células viáveis diminuiu de $20.2 \pm 2.9 \times 10^4$ com o grupo controle para $10.4 \pm 2.5 \times 10^4$ com o e-líquido à 5%.

Quando expostas ao e-líquido com adição do aromatizante em concentrações de 1% e 5% as células osteoblásticas sofreram alteração em sua forma, levando a perda do contato entre as células e a um formato mais arredondado ao se comparar ao grupo controle. Tais observações sugerem a desregulação da adesão celular, o que foi confirmado através da mensuração quantitativa da viabilidade celular. Houve uma diminuição de células viáveis, partindo de uma densidade celular de $30.5 \pm 8 \times 10^4$

com o grupo controle, para $26.6 \pm 9 \times 10^4$ com o e-líquido à 1% e $14.9 \pm 2.9 \times 10^4$ com após a exposição à concentração de 5%.

Com relação à exposição dos osteoblastos ao e-líquido contendo 70% PG-30% VG + aromatizante e 12 mg/mL de nicotina foi observado dano celular em termos de formato e adesão celular. As células partiram de um formato cuboide com núcleos pequenos para uma forma arredondada com núcleos quase não visíveis basicamente no e-líquido na concentração de 5%. Os números de células viáveis caíram significativamente ($p < 0.001$) nessa concentração do e-líquido (5%). A viabilidade celular partiu de uma densidade celular de $45.2 \pm 17 \times 10^4$ no grupo controle, para $37.5 \pm 12 \times 10^4$ com o e-líquido à 1% e então $19.4 \pm 7 \times 10^4$ para o e-líquido à 5%.

Na presença do e-líquido contendo 70% PG-30% VG + aromatizante e nicotina à 18 mg/mL foi observado também alterações morfológicas nas concentrações de 1% e 5%. Com 1% poucas células pareceram aderidas entre si, com poucos dendritos contribuindo para a interação celular. Com 5% um número elevado de células apresentou-se de forma arredondada e flutuante sugerindo efeito negativo desse e-líquido na adesão celular. Através da contagem de células foi possível confirmar a redução da viabilidade celular, com expressão significativa ($p < 0.001$) na exposição ao e-líquido na concentração 5%.

As alterações na morfologia celular representam dano celular, e a relação à adesão celular é importante ser observada uma vez que sua formação é importante para gerar os processos de diferenciação osteogênica, que leva à deposição de cálcio e formação óssea.

Para confirmar a viabilidade celular e capacidade de proliferação, o ensaio de MTT foi realizado para cada grupo avaliado. Os achados demonstram que as alterações na viabilidade celular ocorreram de maneira dose-dependente ao e-líquido exposto, confirmado pela diminuição significativa da proliferação dos osteoblastos.

Após exposição ao e-líquido contendo apenas 70% PG-30% VG as células mostraram uma redução significativa no metabolismo do MTT. A proliferação celular reduziu de uma densidade óptica (DO) de 1.4 ± 0.28 no grupo controle para 1.3 ± 0.26 com o e-líquido na concentração 1%, para 0.6 ± 0.17 à 5%. Isso significa que a proliferação celular foi inibida em mais da metade após o contato do e-líquido na concentração 5%.

Seguindo a mesma tendência de inibição da proliferação celular, os osteoblastos expostos por 24 h ao e-líquido contendo aromatizante associado à 70% PG-30% VG apresentaram respostas semelhantes aos descritos anteriormente. Partiram de uma DO de 1.3 ± 0.3 com no grupo controle e 1% para 0.5 ± 0.16 na concentração de 5% havendo diferença significativa ($p < 0.001$). Sugerindo maior diminuição na proliferação celular.

Para ambos os grupos contendo nicotina, a diferença estatística ($p < 0.001$) também foi encontrada quando as células estavam de contato com uma maior concentração de e-líquido (5%). Para as células expostas ao e-líquido contendo 70% PG-30% VG + aromatizante e 12 mg/mL de nicotina a diminuição do metabolismo de MTT se apresentou com DO de 1.4 ± 0.3 no grupo controle, para 1.3 ± 0.3 com 1% e 0.6 ± 0.2 com 5%. Quanto à exposição ao e-líquido contendo nicotina à 18 mg/mL os valores partiram de uma DO de 1.4 ± 0.3 com o grupo controle e 1% para 0.4 ± 0.2 , havendo um comprometimento maior da proliferação celular à 5%.

Através desses resultados expressivos à 5 %, foi comparado os dados entre os grupos nas mesmas concentrações de 1% e 5%. E foi encontrado diferença estatística na concentração de 5% entre o e-líquido que continha nicotina à 18 mg/mL (G4) quando comparado ao grupo contendo apenas 70% PG-30% VG (G1) ($p=0.006$). Além disso,

nessa mesma concentração de 5% houve uma significativa diferença ($p < 0.001$) entre os dois grupos de e-líquido contendo nicotina (G3 e G4). Os dados sugerem que além da alta concentração do e-líquido (5%), a presença de altas doses de nicotina pode ser responsável pela inibição da proliferação celular. A presença de nicotina adicionada aos principais constituintes (PG e VG) também tem sido apontado como um agente citotóxico relacionado à destruição periodontal. Além de favorecer uma cicatrização óssea mais lenta.

Devido os resultados marcantes de redução na viabilidade celular, o ensaio de LDH foi realizado afim de avaliar os efeitos de citotoxicidade dos e-líquidos através da análise da permeabilidade da membrana celular.

Os resultados mostraram um aumento significativo ($p < 0.001$) da atividade de LDH no meio de cultura quando as células foram expostas à concentração de 5% de e-líquido, em comparação aos grupos controle e 1% em todos os grupos avaliados. Embora haja evidencias na literatura de que a redução da viabilidade celular seja devido aos efeitos tóxicos dos aromatizantes independente da presença de nicotina, nossos resultados diferem, pelo menos com relação ao aroma de tabaco escolhido nessa pesquisa. Não foi encontrada diferença estatística na comparação entre os grupos quando comparados entre as mesmas concentrações, de 1% ($p=0.147$) e 5% ($p=0.059$). Porém, percebemos um aumento da atividade de LDH no grupo de e-líquido contendo o aromatizante de tabaco (G2) partindo de uma DO de 0.824 ± 0.096 no grupo controle para 1.467 ± 0.522 na concentração de 5%. Assim como no grupo contendo maior dose de nicotina (70% PG-30% VG + aromatizante e 18 mg/mL) mostrando valores de 0.82 ± 0.09 no grupo controle para 1.43 ± 0.36 a 5%. Alta atividade de LDH pode sugerir efeito tóxico do e-líquido nos osteoblastos. Estudos futuros são necessários para investigar a via exata que resulta no dano celular, e se tais danos aos osteoblastos poderiam comprometer a mineralização óssea. Assim como estudos que investiguem se as células poderiam ter suas funções reestabelecidas uma vez que o dano é cessado. Esses resultados seriam importantes para análise do comportamento das células formadoras de osso.

Considerações Finais

A presente pesquisa demonstra que a morfologia e viabilidade das células osteoblásticas foram significativamente alteradas de forma dose-dependente ao e-líquido exposto. Evidenciando que a presença de altas concentrações de e-líquido, assim como em altas concentrações de nicotina, podem comprometer a funcionalidade da adesão celular, que possui fundamental importância no desenvolvimento e manutenção dos tecidos. Tais efeitos tóxicos do e-líquido sobre os osteoblastos foram confirmados também pela inibição da proliferação celular.

Os resultados apresentados nesse estudo evidenciam efeitos danosos do cigarro eletrônico às células ósseas, o que poderia levar à um prejuízo na remodelação e regeneração óssea.

Palavras-chave: Cigarro Eletrônico; Osteoblasto; Crescimento celular; Adesão celular; LDH.

ABSTRACT

Electronic cigarettes (E-cigarettes) were design as a substitute for reducing the harmful effects of cigarette smoke and they become very popular among young people. However, vaping leads a greater probability of injuries and changes to oral tissues due to the various constituents in the vaping liquids. An e-liquid contains humectants such as propylene glycol (PG) and vegetal glycerin (VG), flavors and may contain nicotine or not. Following vaping the aerosol gets in contact with different structures of the oral cavity including soft and hard tissues. Such contact could have significant damage on bone cells and tissues. This study aimed to evaluate the effects of the e-liquid constituents on the morphology, the adhesion, viability and cytotoxicity after being exposed to the main constituents of e-liquid (PG and VG). Human tumor-derived osteoblast cells (MG-63) were exposed for 24 h to 0%, 1% or 5% of non-vaped main constituents of e-cigarettes: (70% PG - 30% VG), containing tobacco-flavor or not, as well as nicotine at 12mg/mL or at 18mg/mL or nicotine-free. Changes in cell morphology were observed under an inverted optical microscope. Cell adhesion and viability were assessed by Trypan Blue (TB) assay and MTT assay. Cytotoxicity was measured through LDH assay. Cell morphology and viability were significantly altered in a dose-dependent manner of e-liquid. Morphologically the cells changed from an elongated shape to rounded shapes with disruption of their cytoplasm. Cell viability decreased as the concentration of e-liquid increased, as well as in the presence of a higher concentration of nicotine. Such harmful effects on bone cells could lead to impairment of bone regeneration and remodeling processes.

Keywords: Electronic cigarettes; Osteoblast; Cell adhesion; Cell Growth; LDH.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. E-liquid without flavor changes osteoblast morphology and cell viability.	30
Figure 2. Exposure to E-liquid-containing flavor changes the morphology and viability of osteoblasts.	31
Figure 3. Flavor and nicotine-rich e-liquid have effects on cell morphology and adhesion.	32
Figure 4. E-liquid with a high amount of nicotine decreased the adhesion of osteoblasts.	33
Figure 5. E-liquid with a high amount of nicotine decreased the adhesion of osteoblasts.	34
Figure 6. Comparative effect of 1% and 5% of ep-liquids on osteoblast growth.	35
Figure 7. The exposure of osteoblasts to e-liquids increased the release of LDH.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Different e-liquid being tested with this study.....	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEFs	Dispositivos Eletrônicos para Fumar
E-Cigarettes	Electronic Cigarettes (<i>cigarros eletrônicos</i>)
E-liquid	Vape juice (<i>liquid from using inside an e-cigarette</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
VG	Vegetal Glicerín (<i>glicerina vegetal</i>)
PG	Propylene Glicol (propilenoglicol)
DO	Densidade Ótica
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]
DME	<i>Dulbecco-Vogt's Modified Eagle's medium</i>
TB	Trypan Blue
PBS	Solução tempão de fosfato
CO ₂	Dióxido de Carbono
HCl	Hydrochloric acid (<i>Ácido Clorídrico</i>)
LDH	Lactate Dehydrogenase (<i>Lactato Desidrogenase</i>)
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
SD	Standard Deviation
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAD ⁺	Oxidado
NADH	Reduzido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	JUSTIFICATIVA.....	21
1.1.1	PROBLEMA.....	22
1.2	OBJETIVO.....	22
1.2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2	DESENVOLVIMENTO.....	23
2.1	ARTIGO EM INGLÊS.....	23
	INTRODUCTION.....	25
	MATERIALS AND METHODS.....	26
	RESULTS.....	29
	DISCUSSION.....	36
	REFERENCES.....	40
3	CONCLUSÃO.....	43
4	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo e sua relação com doenças ósseas está bem estabelecido na literatura (LU *et al.*, 2021; SCOLARO *et al.*, 2014), assim como sendo um fator de risco para doenças da cavidade oral como doença periodontal e comprometimento da osseointegração em cirurgia de implantes dentários (CHRCANOVIC; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2015; JAVED; RAHMAN; ROMANOS, 2019; MOMBELLI; MÜLLER; CIONCA, 2012; NASERI; YAGHINI; FEIZI, 2020). Em 2003 a Assembleia Mundial da Saúde adotou o primeiro tratado internacional de saúde proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que foi intitulado Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco. Com o monitoramento das medidas instituídas pela Convenção-Quadro houve uma redução da prevalência do tabagismo, de 28% em 2000 para 15,3% em 2020, segundo relatório sobre o controle do tabaco na região das américas (2022). Entretanto, em 2007 os cigarros eletrônicos surgiram nos Estados Unidos e cresceram em popularidade, sobretudo entre os jovens (U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2014).

Os cigarros eletrônicos surgiram e seu uso foi disseminado como uma alternativa para os fumantes que queriam parar de fumar, porém isso se tornou uma prática popular entre adultos jovens da faixa de 25 à 44 anos (CTADS, 2017). Embora sejam considerados menos prejudiciais do que os cigarros convencionais por não haver a combustão, logo, não há produção do alcatrão e monóxido de carbono, evidências tem mostrado que causa danos à saúde oral (JEON, WONJEONG; CHOI, DONG-WOO; LEE, HYEON JI; LEE, SANG AH; PARK, EUN-CHEOL; JANG, 2019).

Em uma recente revisão sistemática (FIGUEREDO *et al.*, 2021) os autores encontraram valores significantes nos parâmetros clínicos associados com a doença periodontal nos usuários de cigarros eletrônicos, como alto índice de placa, aumento no sangramento gengival e na profundidade de sondagem. Embora esses resultados não sejam suficientes para provar o impacto da utilização dos dispositivos eletrônicos para fumar (DEFs) na periodontite, eles alertam e reforçam a necessidade de maiores estudos a esse sujeito.

Em contraste com o que já se sabe sobre o tabagismo e sua contribuição para um maior risco de desenvolver doenças orais e sistêmicas, as informações sobre os efeitos do uso dos cigarros eletrônicos é insuficiente. Desde 2009, a venda,

importação e propaganda de DEFs são proibidos no Brasil pela justificativa de falta de informações científicas (BRASIL, 2009). Por outro lado, no Canadá, os cigarros eletrônicos foram regulados em 2018 (CANADA, 2018).

Reconhecendo que a utilização de cigarros eletrônicos é uma prática popular entre os jovens e que o número de pacientes que será tratado no futuro irá aumentar, os profissionais da área da saúde precisam ser informados sobre o que esperar e como abordar o assunto com seus pacientes.

1.1 JUSTIFICATIVA

Estudos recentes têm reportado que cigarros eletrônicos podem causar danos semelhantes aos cigarros convencionais (ALMEIDA-DA-SILVA *et al.*, 2021; ROUABHIA, 2020). Tal efeito parece ser devido aos radicais livres presentes no vapor do cigarro eletrônico capazes de promover inflamação e dano tecidual. Estudos *in vitro* que analisaram seus efeitos sobre as células gengivais epiteliais e sobre células fibroblásticas (ALANAZI *et al.*, 2018; BEKLEN; UCKAN, 2021; ROUABHIA *et al.*, 2017) revelaram sua habilidade de induzir apoptose e necrose celular, assim como alteração na morfologia celular, comprometendo a funcionalidade dessas células, e portanto poderia contribuir no desenvolvimento da doença periodontal devido ao envolvimento do tecido epitelial.

Uma vez que a cavidade oral é o primeiro local a entrar em contato com a fumaça do cigarro ou com o aerossol produzido pelo cigarro eletrônico, tanto tecidos moles quanto tecidos duros podem ser prejudicados. Portanto, investigar os efeitos da utilização dos cigarros eletrônicos sobre os osteoblastos é importante, uma vez que os mesmos são células chave para a formação óssea.

Com a falta de padronização dos componentes líquidos utilizados nos dispositivos eletrônicos para fumar, o conhecimento sobre os seus efeitos aos tecidos ósseos ainda é escarço e inconclusivo (OTERO *et al.*, 2019; ROUABHIA *et al.*, 2019; WAVREIL; HEGGLAND, 2020). Portanto, a avaliação dos efeitos de diferentes componentes presentes no e-líquido se faz necessária.

1.1.1 PROBLEMA

Considerando o que foi exposto, e que o número de usuários de cigarros eletrônicos vem aumentando entre os jovens, essa pesquisa *in vitro* visou estudar quais os efeitos que os principais constituintes do e-líquido podem causar no comportamento dos osteoblastos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos constituintes presentes no e-líquido sobre a linhagem celular do tipo osteoblastos de osteossarcoma humano (MG-63) . Considerando os vários constituintes que podem ser encontrados no líquido do cigarro eletrônico, quatro apresentações do e-líquido, em diferentes concentrações, foram propostas para essa pesquisa.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e determinar os efeitos dos principais constituintes do e-líquido na morfologia e adesão dos osteoblastos;
- Avaliar os efeitos dos componentes do e-líquido na proliferação dos osteoblastos;
- Avaliar e determinar a citotoxicidade dos componentes do e-líquido através da análise dos níveis de liberação da lactato de desidrogenase (LDH), em diferentes concentrações;
- Comparar os grupos na mesma concentração para determinar maior toxicidade de algum dos constituintes do e-líquido.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ARTIGO EM INGLÊS

Artigo formatado seguindo as normas para publicação do *Online Journal of Biological Sciences*

Effects of electronic cigarette e-liquids on the adhesion and growth of osteoblast cells

Lorenz-Vieira AC^{1,2}, Benfatti CAM^{2,3}, Rouabhia M¹.

Ana Carla Lorenz-Vieira^{1,2}, Cesar Augusto Magalhães Benfatti^{2,3} and Mahmoud Rouabhia¹

¹ Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Québec, QC, Canada.

² Center for Education and Research on Dental Implants (CEPID), Post-Graduate Program in Dentistry (PPGO), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianopolis, SC, Brazil.

³ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianopolis, Brazil.

Running title: e-cigarette and osteoblasts

Corresponding author:

Dr. Rouabhia M (mahmoud.rouabhia@fmd.ulaval.ca).

Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval.

2420 rue de la Terrasse, Québec G1V 0A6, QC, Canada.

Telephone: 418-656-2131, poste 416321

Fax: 418-656-2861

Ethics: The authors declare that there are no conflicts of interest in connection with this article.

Abstract

Electronic cigarettes were designed to replace traditional cigarettes to decrease harmful smoking effects. However, e-liquids contain several chemicals that may have adverse effects on the oral cavity. This study aimed to evaluate the effects of the non-vaped e-liquid constituents on osteoblasts' morphology, adhesion, proliferation, and cytotoxicity. Human osteoblast cells (MG-63) were exposed to e-liquid containing 70% PG - 30% VG with and without flavor, and with or without nicotine. The e-liquids were used at various concentrations (0%, 1%, or 5%). The osteoblasts' morphology and adhesion were assessed after 24 h. The cell growth was analyzed using an MTT assay. The e-liquids' cytotoxicity was tested by LDH measurement. We showed that all tested e-liquid induced significant morphological change to the cell shape and decreased cell adhesion.

Furthermore, the presence of nicotine contributes to decreasing cell adhesions. The e-liquids significantly reduce osteoblast growth but increase the level of LDH. The study pointed out the potentially harmful effects of e-cigarettes on bone cells that could lead to the impairment of bone regeneration and remodeling processes.

Keywords: Electronic cigarettes; Osteoblast; Cell adhesion; Cell growth; LDH.

INTRODUCTION

Cigarette smoking causes harmful effects associated with oropharyngeal and lung cancer, cardiovascular illnesses, and chronic diseases. It is the leading cause of avoidable death (U. S. Department of Health and Human Services, 2014). The continuous use of cigarettes is due to the addictive tobacco-derived product such as nicotine in cigarette smoke (Benowitz et al., 2009). More than 7,000 chemical components are found in cigarette smoke, depending on cigarette type and brand. Many of these chemicals cause health damage to smokers (Onor et al., 2017). The oral cavity is the first body site getting in contact with cigarette smoke. Smokers have an increased risk of developing oral lesions that may be associated with cancer development (U. S. Department of Health and Human Services, 2014). Furthermore, tobacco users are susceptible to different oral infections, including candidiasis, periodontal diseases, and a higher risk of failure when undergoing dental implants (Javed et al., 2019).

To reduce the adverse effect of cigarette smoke, a new smoking device called an electronic cigarette (e-cigarette) was developed and advertised to smokers.

E-cigarettes are composed of a battery and a cartridge to hold a liquid to be aerosolized, producing the vapor by an electrical heater (Otero et al., 2019). The liquid is constituted of propylene glycol (PG) and vegetable glycerin (VG), and it might contain nicotine. To become attractive, e-liquids are supplemented with flavorings such as tobacco, menthol, candy, and many others (Breland et al., 2017). These flavors could be of damage the airways of e-cigarette users (Allen et al., 2016; Ramôa et al., 2017).

PG and VG are humectants mimicking cigarette smoke and are transporters for nicotine during vaping. Indeed, VG provides visual smoke and improves taste and smell, while PG is related to sore throat, headache, and dizziness (Harvanko et al., 2019). Both are the main constituents of the e-liquid, and, in general, they are considered safe ingredients for oral ingestion (FDA, 1980). However, there is no consensus on their safety when heated and inhaled.

The oral cavity is the first site to be in contact with e-cigarette aerosols. Such e-liquid products get in contact with the teeth, the gingival tissue, and the oral microorganisms. It has been shown that e-liquids and their aerosol can be of cariogenic properties as they contain nicotine and sugary flavors (Kim et al., 2018). Furthermore, it has been

reported that the humectants (PG and VG) increased the adhesion of *Streptococcus mutans* to the e-cigarette users' teeth, and increased the formation of biofilm (dental plaque) (Rouabhia and Semlali, 2021). Also, e-cigarettes may be associated with periodontal inflammation due to the e-liquid chemical negative interaction with epithelial tissue. Studies have shown that exposure to e-cigarette aerosol decreased the adhesion and proliferation of gingival fibroblasts and epithelial cells (Alanazi et al., 2018; Beklen and Uckan, 2021; Rouabhia et al., 2017). It was also reported that e-cigarette flavors could be of significant damage leading to high oxidative stress and DNA damage and an increase of destructive inflammatory cytokines secretion, contributing to tissue damage (Javed et al., 2019). Oral tissue damage through e-cigarette aerosol can be on soft tissue (gingival mucosa) and hard tissues (bone), as well as on the interaction of the gingival tissue with oral bone and restorative materials, such as dental implants. A previous study reported an adverse effect of e-cigarette aerosol on the interaction of osteoblasts with the dental implant by decreasing the expression of F-actin, the growth of the cells, which compromises the formation of bone tissues. Such deregulation would suggest postoperative complications and even implant failure (Rouabhia et al., 2019).

Although several studies pointed out the possible harmful effect of e-cigarette aerosol on the oral cavity, more studies are still needed to appreciate the adverse effect of e-cigarette chemicals on the user's oral health. This study aimed to evaluate the effects of non-aerosolized e-cigarette e-liquid on the adhesion and growth of osteoblasts. We specifically evaluated the effect of different e-liquids containing or not flavor with and without nicotine on the osteoblast adhesion, morphology, growth, and the release of Lactate dehydrogenases.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human osteosarcoma cells, MG-63, with osteoblastic properties (ATCC, CRL-1427™), were selected for this study. The cells were cultured in an osteogenic induction medium (Tazi et al., 2012) consisting of 3:1 (v/v) Dulbecco-Vogt's Modified Eagle's (DME) medium and Ham's F-12 (H) supplemented with 24.3 µg/mL adenine, 10 µg/mL human epidermal growth factor, 0,4 µg/mL hydrocortisone, 5 µg/mL bovine

insulin, 5 µg/mL human transferrin, 2×10^{-9} M 3, 3', 5' – triiodo-L-thyronine, 100 µg/mL penicillin, 25 µg/mL gentamicin, and 10% fetal calf serum. The incubation was performed at 37°C in a humid 5% CO₂ atmosphere to maintain cell growth. The culture medium was refreshed after each 24 h until a confluence of 80-90% was reached.

Source of E-liquid

E-liquids were purchased from local retailers (Québec City, QC, Canada). The selected e-liquids were chosen as per their availability and use by consumers. The e-liquids we used contained either 70% PG-30% VG, 70% PG-30% VG + Flavor, 70% PG-30% VG + Flavor + nicotine at 12 mg/ml, or 70% PG-30% VG + Flavor + nicotine at 18 mg/ml (Table 1). The flavor being tested in this study was artificial tobacco flavoring (Smooth Canadian Tobacco). Different concentrations (0%, 1%, and 5%) of each e-liquid were used to perform the experiments.

Table 1: Different e-liquid being tested with this study

Subset	Constituent
G1	70% PG - 30% VG
G2	70% PG-30% VG + Flavor
G3	70% PG-30% VG + Flavor + nicotine at 12mg/ml
G4	70% PG-30% VG + Flavor + nicotine at 18 mg/ml)

G: GROUPS; PG: PROPYLENE GLYCOL; VG: VEGETABLE GLYCERIN; 0% CORRESPOND TO CONTROL GROUP

The effect of e-liquids on osteoblasts adhesion and morphology

Osteoblastic cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/well in 6-well plates. The culture medium was supplemented with one or the other e-liquid at various concentrations (0%, 1 % or 5%), with a total volume of 2 ml per well. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ for 24h. At the end of this exposure period, the cell adhesion was evaluated qualitatively by photographing the adherent and non-adhering cells using a digital camera (model COOPLPIX 995, Nikon). This was confirmed by a quantitative measurement using trypan blue exclusion assay. Briefly, the cells were detached from each culture well-using trypsin; they were washed twice with culture medium and used for cell viability analysis. Each cell pellet was suspended

in 1 mL of culture medium, a 20 μ l volume of each cell suspension was suspended with 20 μ l of TB and incubated in iced for 5 min. The cell mixture was placed into a hemacytometer. Viable cells (non-labeled in bleu) and dead cells (labeled in blue) were counted using an inverted optical microscope (Nikon Optiphot). The experiments were repeated at least 3 independent times in duplicates.

The effect of e-liquid constituents on osteoblasts growth

Osteoblast cells were seeded (2×10^5 cells/well) in each well of 12-well plates. In 1 mL of culture medium, then incubated for 48 h at 37°C in a 5% CO₂ before being exposed to e-liquid. The medium was then refreshed for each culture and supplemented with 0%, 1 %, or 5% of each e-liquid group (G1, G2, G3, and G4). The cell exposure to e-liquid was for 24 h at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. To evaluate the toxicity of e-liquids on osteoblast cells, we used an MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide)] assay, as previously reported (Denizot and Lang, 1986). Briefly, 1% (v/v) of MTT solution (5 mm/mL) was added to each well; the plates were wrapped with aluminum foil and incubated for 3 h at 37°C. After incubation, the supernatant was removed, the culture was rinsed once with worm PBS, and 500 μ L of 0.04 M HCl in isopropanol was added to each well and incubated at room temperature, under agitation for 15 minutes in the dark. Following incubation, 120 μ L of the reaction solution was transferred in quadruplets to a 96-well plate, and the absorbance of the colored solution was read at 550 nm using a spectrophotometer (Model 680; BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

The effect of e-liquid constituents on lactate dehydrogenase (LDH) activity

Osteoblasts were seeded at 2×10^5 cells/well in 6-well plates and exposed to the e-liquid solutions at 0%, 1%, and 5% concentrations for 24 h. At the end of the incubation, the cell culture medium was collected and used to measure cell toxicity by LDH cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI, USA) (Melo et al., 2002). Briefly, 50 μ L of supernatant was transferred to a 96-well flat-bottom plate and supplemented with 50 μ L of reconstituted substrate mix, then incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. The assay promotes a conversion reaction of L-lactate and NAD to pyruvate and NADH through the oxidation of NADH to NAD⁺, then

releasing LDH into the cell culture medium due to the rupture of the plasma membrane (Gleitz et al., 1996). The reaction was stopped using 50 μ L of an acid solution added to each well. Subsequently, 100 μ L of each reacted solution was transferred, in quadruplicates, to a new 96-well flat-bottom plate and the absorbance was read using an X-Mark microplate spectrophotometer (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) at 490nm wavelength. A positive control referring to the cell incubation in the presence of 1% Triton x 100 was prepared to generate maximum LDH release. A negative control referring to the cell incubation without e-liquid was included in the experiments to generate minimum LDH release. The experiment was repeated at least three independent times, in duplicate.

Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard deviation (SD), considering that each experiment was performed at least three times. Data were analyzed by comparing differences between control (0% e-liquid) and test substances in the different concentrations (1% and 5%). Data normality was assessed by Shapiro-Wilk test and Levene's test of variance. *P value* was considered significant at < 0.05 . A one-way analysis of variance (ANOVA) parametric test was used to determine the statistical significance between the values having a normal distribution. For the data with non-normal distribution, a non-parametric Kruskal Wallis test was performed. Followed by post hoc analysis, Tukey and Bonferroni's adjustment of p-value has been applied to compare differences between intra- and inter-groups. All those statistical analyses were performed using SPSS version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

RESULTS

E-liquids modulate osteoblast morphology and deregulate the cell adhesion

We included in this study different types of e-liquids based on their compositions. These e-liquids included 70% PG-30% VG with and without flavor, and with and without nicotine. Each e-liquid was tested at different concentrations (0%, 1%, and 5%), considering 0% as the control (only culture medium). After 24-h exposure to the e-liquid, we analyzed the cell adhesion.

The cell exposure to the 70% PG-30% VG showed shape change and reduced adhesion with the high concentration (5%) of this e-liquid (Fig 1). In Figure 1A, the cell morphology was changing, showing round cells without any cell contact between each other, as compared to the control (Fig 1 A). These observations were confirmed quantitatively (Fig. 1B). The cell viability assessed by trypan blue exclusion showed a significant ($p < 0.001$) reduction of the viable cell number following cell contact with e-liquid containing 70% PG-30% VG. Indeed, the viable cell number decreased from $20.2 \pm 2.9 \times 10^4$ cells with the control to $18.6 \pm 2.9 \times 10^4$ cells with e-liquid at 1% to $10.4 \pm 2.5 \times 10^4$ cells at 5%. (Fig 1 B).

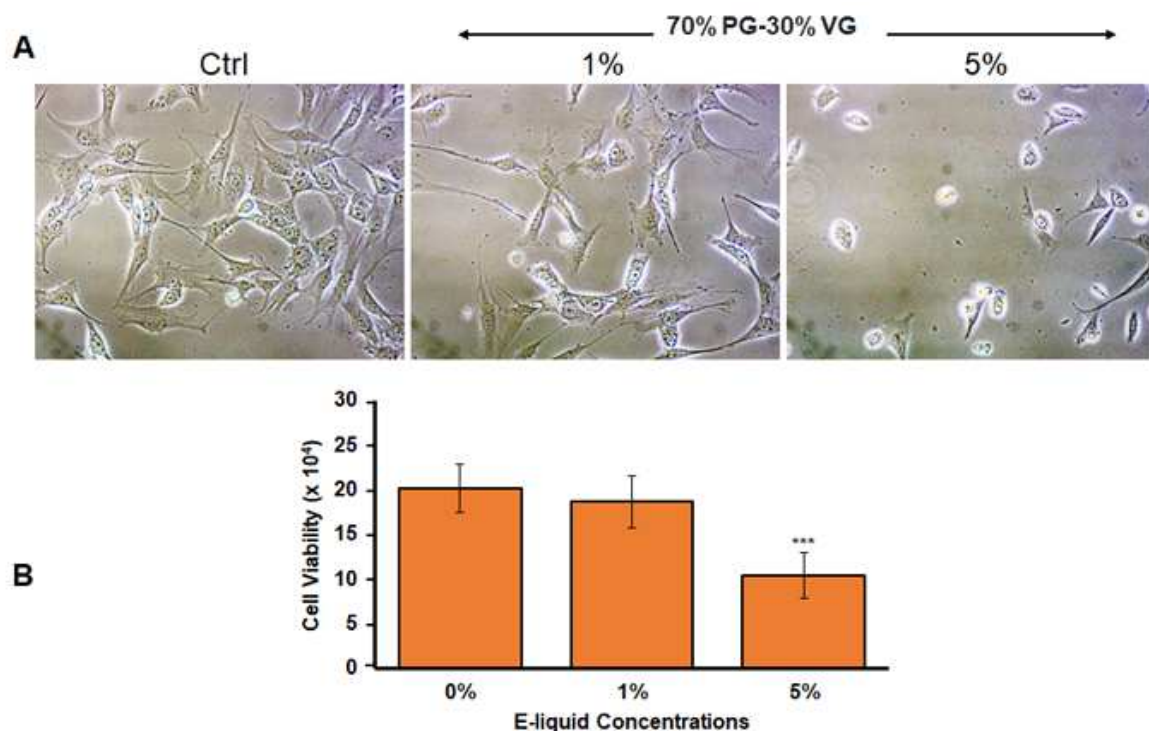


Fig. 1. **E-liquid without flavor change osteoblast morphology and cell viability.** **A)** Osteoblasts shape after exposure to various concentrations (0, 1%, and 5%) of 70% PG - 30% VG e-liquid for 24 h. Representative images were observed under an inverted optical microscope. **B)** Cell adhesion was evaluated by Trypan Blue exclusion assay. Each bar represents the mean \pm SD of at least three independent experiments. *** $p < 0.001$ when comparing the control to the 5% condition.

The exposure to an e-liquid containing 70% PG-30% VG + flavor at 1% and 5% affected the osteoblast shape (Fig 2A), leading to round cells with no cell contact as compared to the control (non-exposed cells to the e-liquid), suggesting the deregulation of cell adhesion. These observations were quantitatively confirmed using cell viability measurements. As shown in Figure 2B, cell viability decreased following the exposure to flavor-rich e-liquid (70% PG-30% VG). The viable cell number

decreased from $30.5 \pm 8 \times 10^4$ cells with the control to $26.6 \pm 9 \times 10^4$ cells with e-liquid at 1% to $14.9 \pm 2.9 \times 10^4$ cells at 5% (Fig 2 B). The decrease was significant ($p < 0.001$) with 5% e-liquid.

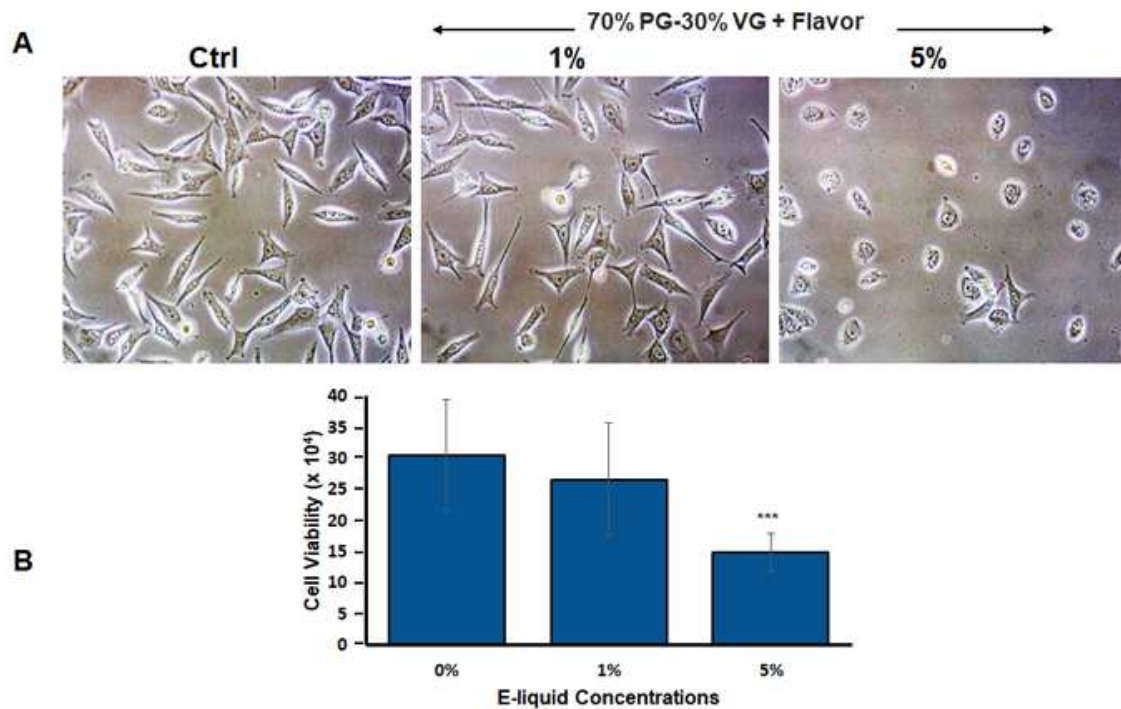


Fig. 2. **Exposure to E-liquid-containing flavor changes the morphology and viability of osteoblasts.** **A)** shows cell morphology after exposure for 24 h to e-liquid containing 70% PG - 30% VG + flavor. **B)** Number of adherent osteoblasts as evaluated by Trypan Blue exclusion assay. Results are the mean \pm SD of at least three independent experiments. *** $p < 0.001$ when comparing the control to the 5% condition.

The exposure to a 70% PG-30% VG + flavor + nicotine at 12 mg/mL led to osteoblast damage in terms of cell shape and adhesion. As shown in Figure 3A, the cell morphology changed from cuboidal with a small nucleus to round cells with an almost non-visible nucleus, basically with the 5% e-liquid concentration (Fig 3A). The morphological changes were supported by cell viability assessment. As shown in Figure 3B, the cell viability decreased significantly ($p < 0.001$) after exposure to various concentrations of the e-liquid containing 70% PG-30% VG + flavor + nicotine at 12 mg/mL. This viable cell number dropped from $45.2 \pm 17 \times 10^4$ cells with the control to $37.5 \pm 12 \times 10^4$ cells with e-liquid at 1% to $19.4 \pm 7 \times 10^4$ cells at 5%. (Fig 3 B). The decrease was significant ($p < 0.001$) with 5% e-liquid.

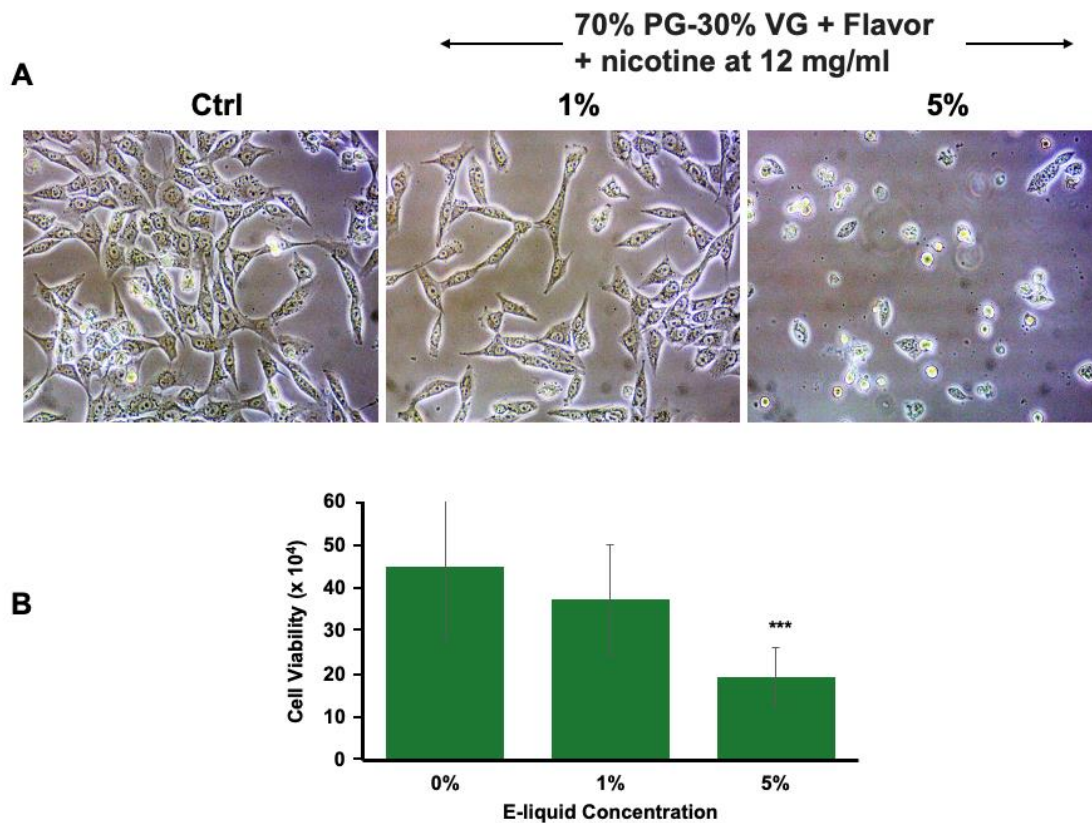


Fig. 3. **Flavor and nicotine-rich e-liquid have effects on cell morphology and adhesion.** Osteoblasts were cultured in the presence of e-liquid containing 70% PG - 30% VG + flavor + nicotine at 12mg/mL for 24 h. **A)** Osteoblast morphology **B)** live adhesion as evaluated by Trypan Blue exclusion assay. Results are presented as the mean \pm SD of at least three independent experiments. *** $p < 0.001$.

The cell exposure to the 70% PG-30% VG + flavor + nicotine at 18 mg/mL also showed morphological changes with both 1% and 5% concentrations of the e-liquid. With the 1%, fewer cells were adhering with reduced interaction between the cells as few dendrites contributed to cell interaction (Fig 4A). The 5% high number of cells were round and floating, suggesting the negative effect of this e-liquid on cell adhesion (Fig 4A). The cell viability assessment confirmed these observations. As shown in Figure 4B, there is a significant reduction ($p < 0.001$) of the viable cells at 5% exposure to the 70% PG-30%VG + Flavor + nicotine at 18 mg/m e-liquid.

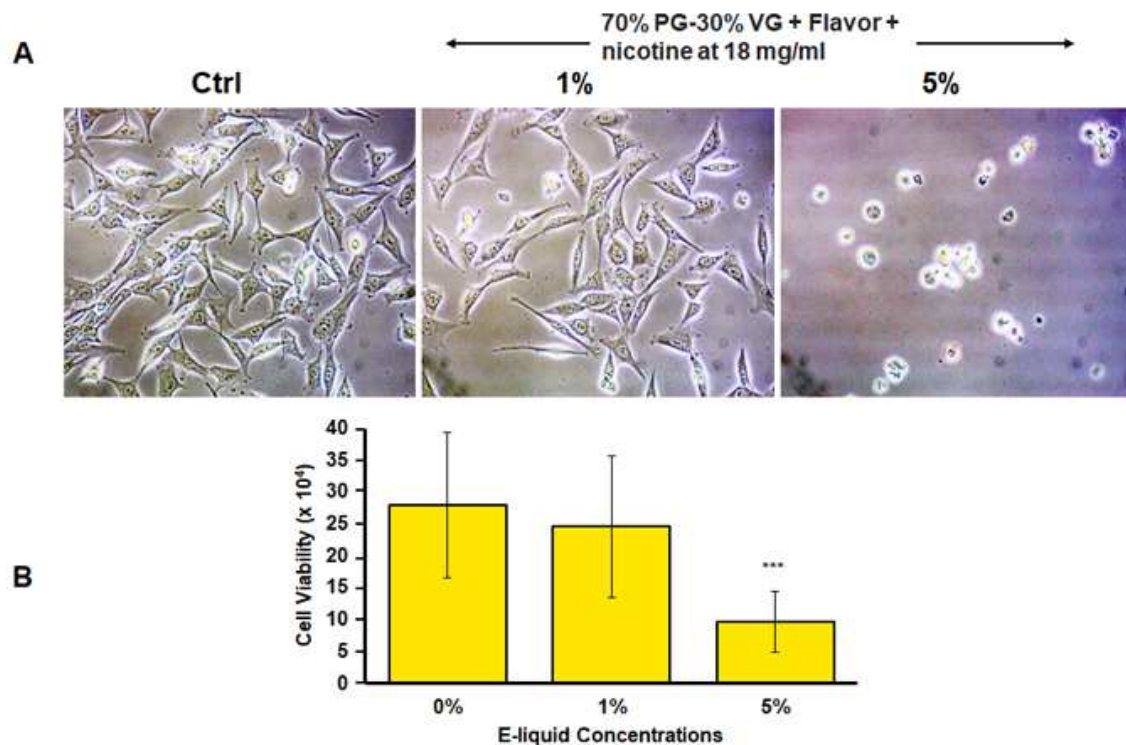


Fig. 4. **E-liquid with a high amount of nicotine decreased the adhesion of osteoblasts.** The cells were seeded in the presence or not of e-liquid containing 70% PG - 30% VG + flavor + nicotine at 18 mg/mL and cultured for 24 h. Cell morphology was flowed by optical microscope observation (A), and cell viability was assessed by Trypan Blue exclusion assay. The cell viability results were presented as the mean \pm SD of at least three independent experiments. *** $p < 0.001$.

Overall, these results showed that the e-liquids we tested decreased cell adhesion. The decrease was greater in the presence of nicotine at 12 or 18 mg/ml. Such reduction of cell adhesion may suggest a toxic effect of the liquids on osteoblast cells.

Osteoblast growth decreased following contact to e-liquid

To confirm cell viability and its proliferation capacity we performed the MTT assay in each group. We found growth reduction in a dose-dependent manner of e-liquids (Fig. 5). Indeed, when exposed to the 70% PG-30% VG the cells showed a significant ($p < 0.001$) reduction in MTT metabolism (Fig 5a). Cell absorbance decreased from 1.39 ± 0.28 in control to 1.34 ± 0.26 with e-liquid at 1% to 0.65 ± 0.17 at 5%. It should be noted that the e-liquid at 5% inhibited at least two times the osteoblast growth.

Following exposure to the e-liquid containing flavor associated with 70% PG-30% VG the data shown in figure 5b demonstrate similar results of the condition described previously, from 1.31 ± 0.32 with the control to 1.28 ± 0.3 at 1% to 0.54 ± 0.16 at 5%. A significant difference ($p < 0.001$) was found at 5% compared to the control and the

1% as well (Fig 5b), meaning a more significant decrease in cell proliferation due to the exposure to 70% PG-30% VG + flavor.

When the osteoblasts were exposed to 70% PG-30% VG + flavor + nicotine at 12 mg/mL, the cell growth decreased, as shown in Figure 5c. The absorbance decreased from 1.38 ± 0.35 with the control to 1.35 ± 0.35 with 1% to 0.56 ± 0.23 at 5% e-liquid. The 5% concentration of this e-liquid showed a significant ($p < 0.001$) decrease in osteoblasts proliferation (Fig 5c).

In the same way as the other groups, after exposure to e-liquid 70% PG-30% VG + flavor + nicotine at 18 mg/mL, a statistical difference was found at 5% ($p < 0.001$) compared to the control and 1%. However, at 5%, the ability of cell proliferation was more compromised, with a decrease in absorbance from 1.44 ± 0.3 from the control to 0.4 ± 0.2 with the 5% (Fig 5d).

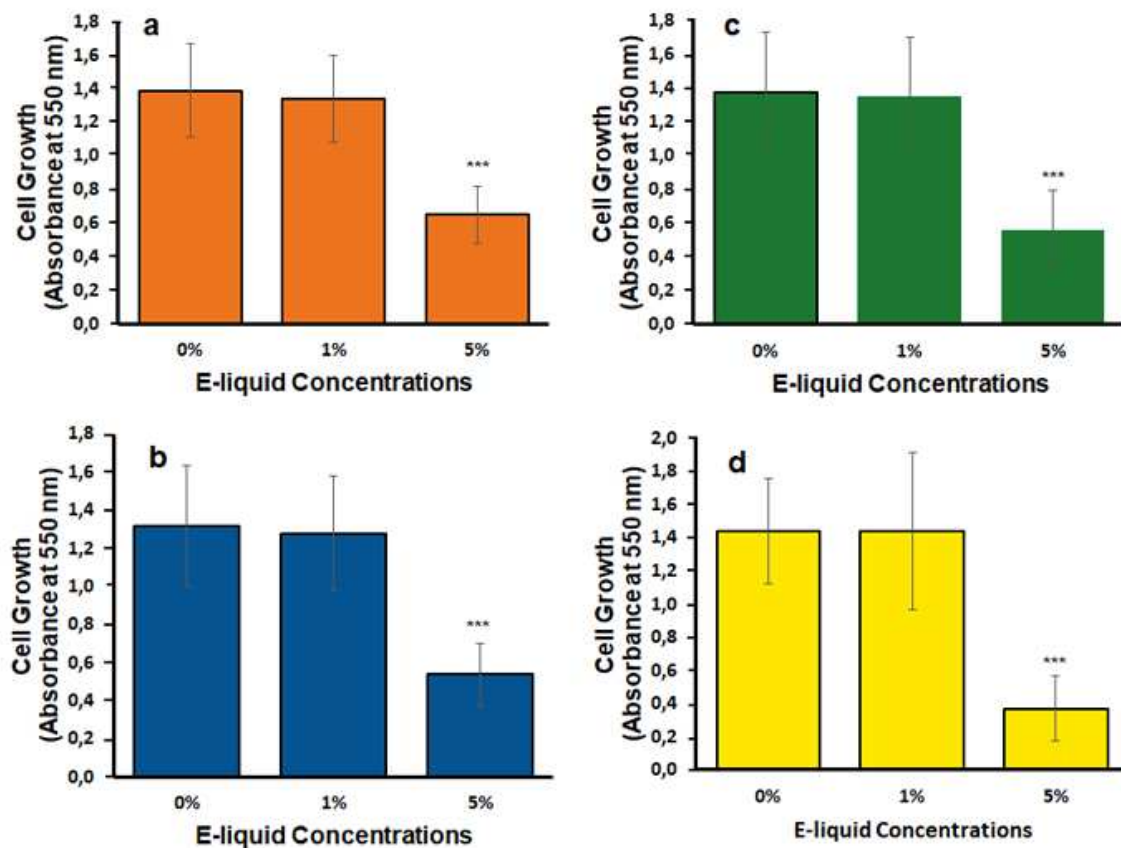


Fig. 5. **All tested e-liquids decreased the growth of osteoblast cells.** The osteoblasts were seeded and cultured for 24 or 48 h, prior to exposure to e-liquids. The cells were then fed fresh medium containing or not e-liquid with and without flavor, and with and without nicotine at 12 mg/ml or 18 mg/ml. Cells were cultured for 24 h and then subjected to an MTT colorimetric assay. The presented results are the mean \pm SD of at least three independent experiments. (a) e-liquid containing 70% PG – 30% VG only; (b) e-liquid containing 70% PG – 30% VG + flavor; (c) e-liquid containing 70% PG – 30% VG + flavor + nicotine at 12 mg/mL; and (d) e-liquid containing 70% PG – 30% VG + flavor + nicotine at 18 mg/mL. *** $p < 0.001$.

The comparison of the results of the different groups at 1% and 5% showed interesting effects. A statistical difference regarding cell growth inhibition was found at 5% e-liquid in the group containing nicotine at 18 mg/mL (G4) when compared to the group containing 70% PG – 30% VG only (G1) ($p=0.006$). Additionally, a significant difference was found when comparing both groups containing nicotine (G3 and G4) ($p < 0.001$) (Fig. 6). Besides, the findings with 5% concentration suggest that nicotine in high concentration (18 mg/ml) affects more the osteoblasts growth.

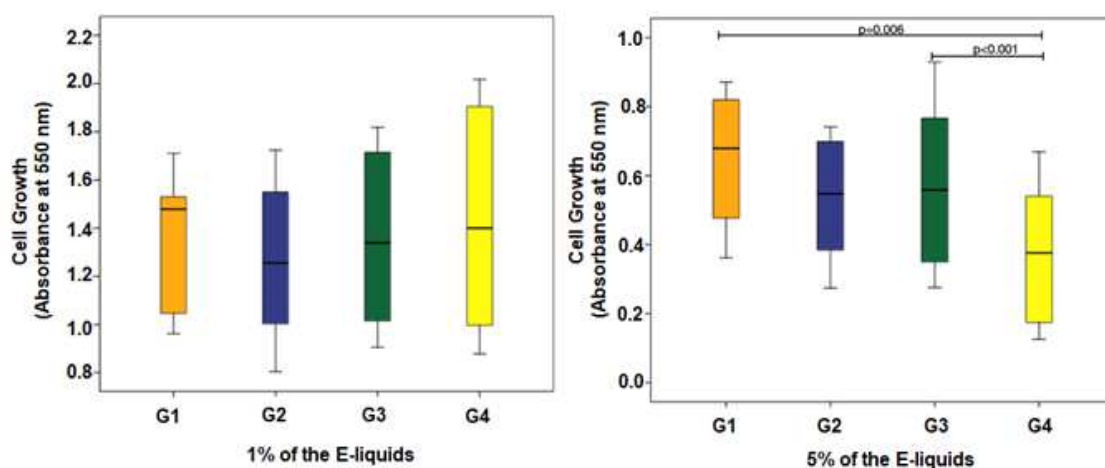


Fig. 6. **Comparative effect of 1% and 5% of e-liquids on osteoblast growth.** After contact for 24 h with each e-liquid at various concentrations, we compared the growth rate with 1% or 5% of the e-liquids to each other. G1 refers to e-liquid containing 70% PG – 30% VG, G2 refers to 70% PG – 30% VG + flavor, G3 refers to 70% PG – 30% VG + flavor + nicotine at 12 mg/ml, and G4 refers to 70% PG – 30% VG + flavor + nicotine at 18 mg/ml.

E-liquid induces greater LDH levels by osteoblasts

The adhesion and growth reduction we demonstrated could be due to a toxic effect of the e-liquids. Thus, we measured the LDH levels after osteoblasts contact with the e-liquids for 24 h. The results showed (Fig. 7) a significant ($P < 0.001$) increase in LDH activity in the culture medium when the cells were exposed to e-liquid at a concentration of 5% concentration compared to the control and 1% solution. We did not find a statistical difference comparing the groups in a concentration of 1% ($p = 0.147$) and 5% ($p=0.059$). However, we noted an increased level of LDH in the e-liquid with tobacco flavor from 0.82 ± 0.09 (control) to 1.47 ± 0.52 at 5%, as well as in the e-liquid group containing 18 mg/mL of nicotine, showing an increased value from 0.82 ± 0.09 in the control to 1.43 ± 0.35 at 5%. The high amount of LDH we showed confirmed

the toxic effect of the e-liquids reducing the adhesion and growth of osteoblasts (Fig. 7).

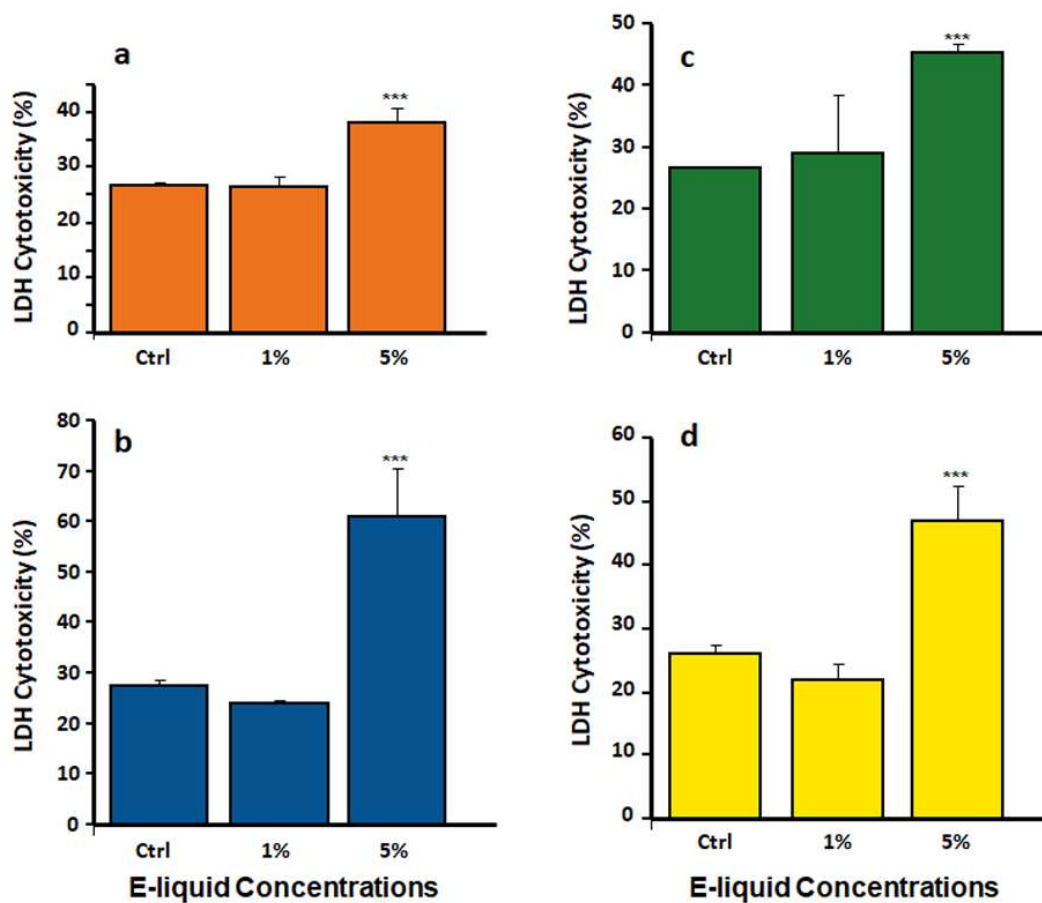


Fig. 6. **The exposure of osteoblasts to e-liquids increased the release of LDH.** Following exposure of the osteoblasts to the different e-liquids, the supernatants were used to measure the LDH release using the LDH-Cytotoxicity Assay Kit. (a) 70% PG-30% VG, (b) 70% PG-30% VG + flavor, (c) 70% PG-30% VG + flavor plus nicotine at 12 mg/ml, and (d) 70% PG-30% VG + flavor + nicotine at 18 mg/ml. Data are presented as percentages of levels of LDH. *** $p < 0.001$.

DISCUSSION

Combustible cigarettes are well-known induction significant damage to the oral cavity, increasing periodontal diseases, implant failure, etc. (Chapple et al., 2018; Javed et al., 2019), and are a risk factor for osteoporosis and bone fracture (Bethesda, 2018; CDC - Centers for Disease Control and Prevention., 2018). To overcome these adverse effects, e-cigarettes have emerged as an alternative to the negative effects of combustible cigarettes. Several studies have reported damage to gingival cells and tissues (Alanazi et al., 2018; Rouabhia et al., 2017), which may compromise oral and

periodontal health. The effects of e-cigarettes on the oral cavity could be linked to the chemicals in the vaped e-liquid. However, there is no available study investigating the interaction of osteoblasts with different e-liquid before aerosolizing. This study demonstrated that non-vaped e-liquid significantly reduced osteoblast adhesion. Such observation is supported by a previous study from our group showing that vaped e-liquid also negatively affects osteoblast adhesion (Rouabhia et al., 2019).

Osteoblast cells are an essential cell type involved in bone formation and regeneration following damage. They also produce and mineralize bone matrix through a sequence of events related to cell adhesion and proliferation (Caetano-Lopes et al., 2007). Our results demonstrated that direct exposure to e-liquids could change osteoblast morphology and viability, compromising cell adhesion. Cell damage was identified initially by morphological analysis in which cells began to show subtle changes in their shape from 1% e-liquid concentration, displaying a tendency to cluster and rupture its cytoplasm at 5%. This study is supportive of the one reported by Shaito et al (2017), showing that the exposure of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) to cigarette and e-cigarette aerosol extracts deregulates cell adhesion and morphology. Cell adhesion is a key osteogenic differentiation process, leading to calcium deposition and bone formation (Salasznyk et al., 2007). The deregulation of osteoblast adhesion could lead to a decrease of cell viability. The current study investigated cell viability after exposure to each e-liquid, demonstrating a decrease of viable osteoblasts confirming the cell morphology changes. Similar results were reported with osteoblasts being exposed to e-cigarette aerosols (Rouabhia et al., 2019). The effect of e-liquids on cell adhesion was confirmed by evaluating cell growth. Our results showed that the non-vaped e-liquids caused a significant reduction in osteoblast viability and growth.

Furthermore, the presence of flavor in combination with a higher concentration of nicotine (18 mg/mL) caused more cell death. These results agree with Rowell et al. (2017), reporting a link between increasing nicotine doses and reducing the percentage of viable cells. The presence of nicotine in the e-liquid to be vaped could cause cytotoxicity to gingival epithelial cells leading to periodontal tissue destruction (Beklen and Uckan, 2021). Nicotine could inhibit tumor necrosis factor α expression through the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway and, therefore, delay bone healing (Chen et al., 2011). The presence of nicotine impairs bone healing,

possibly by preventing cellular maturation and proliferation, thus interrupting bone tissue (Scolaro et al., 2014).

Another component of the e-liquid that has been linked to e-cigarette toxicity is the flavoring agents. Otero et al., (2019) analyzed the e-liquid cytotoxicity on human MG-63 and Saos-2 osteoblast-like cells and reported a decrease in cell viability, suggesting a toxic effect independently of the presence of nicotine. The authors pointed out cinnamon flavoring as the most significant contributor to cytotoxicity, confirming those results reported by other authors (Sassano et al., 2018; Wavreil and Heggland, 2020) along with vanilla flavoring. The effect of e-liquid on osteoblast behavior was supported by an increased level of LDH, with a significant increase in the presence of nicotine. The toxicity of flavors is dependent on the flavor type and amount. It has been reported that tobacco flavor presents less toxicity than fruity flavors in human pharyngeal cells when the e-liquid was used at a 10% solution (Welz et al., 2016). Our results showed a decrease, but not significant, of the LDH level when the e-liquid contains flavor. On the other hand, it should be noted that nicotine in the e-liquid promoted LDH release confirming the toxic effect of e-liquid on osteoblast behaviors.

In conclusion, this study points out the potentially harmful effects of non-vaped e-liquids on bone cells. Such effects were like those reported with other studies with vaped or non-vaped e-liquids (Behar et al., 2018; Otero et al., 2019; Rowell et al., 2017). These effects suggest the detrimental effects of vaped and non-vaped e-liquid on osteoblast behaviors, bone regeneration, and remodeling processes.

Acknowledgments:

We thank Dr. Karin Apaza-Bedoya for the collaboration on the statistical analysis of the data. We would also like to thank Dr. Débora M. Pasin for the critical review of this manuscript.

Funding Information

This work was supported the NSERC, grant no. RGPIN-2019-04475, as well as the Fonds Émile-Beaulieu de l'Université Laval, grant no. [FO123458](#).

Author's Contributions

M.R. contributed to the conception and design of this study; A.C.L.V and M.R.

performed the experiments; A.C.L.V. and M.R. analyzed the data; A.C.L.V., C.A.M.B., M.R. interpreted results of experiments. A.C.L.V and C.A.M.B drafted the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Alanazi, H., Park, H.J., Chakir, J., Semlali, A., Rouabhia, M., 2018. Comparative study of the effects of cigarette smoke and electronic cigarettes on human gingival fibroblast proliferation, migration and apoptosis. *Food Chemical Toxicology*, 118, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.049>.
- Allen, J.G., Flanigan, S.S., LeBlanc, M., Vallarino, J., MacNaughton, P., Stewart, J.H., Christiani, D.C., 2016. Flavoring Chemicals in E-Cigarettes: Diacetyl, 2,3-Pentanedione, and Acetoin in a Sample of 51 Products, Including Fruit-, Candy-, and Cocktail-Flavored E-Cigarettes. *Environmental Health Perspectives*, 124, 733–739. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510185>.
- Behar, R.Z., Wang, Y., Talbot, P., 2018. Comparing the cytotoxicity of electronic cigarette fluids, aerosols and solvents. *Tobacco Control*, 27, 325 LP – 333. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053472>.
- Beklen, A., Uckan, D., 2021. Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. *Human Experimental Toxicology*. 40, 25–34. <https://doi.org/10.1177/0960327120943934>.
- Benowitz, N.L., Hukkanen, J., Jacob, P., 2009. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers, in: Henningfield, J.E., London, E.D., Pogun, S. (Eds.), *Nicotine Psychopharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2.
- Bethesda, M., 2018. Smoking and Bone Health. National Institutes of Health (NIH) Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center, 18–7883, 1–6.
- Breland, A., Soule, E., Lopez, A., Ramôa, C., El-Hellani, A., Eissenberg, T., 2017. Electronic cigarettes: what are they and what do they do? *Annals of The New York Academy Sciences*, 1394, 5–30. <https://doi.org/10.1111/nyas.12977>.
- Caetano-Lopes, J., Canhão, H., Fonseca, J.E., 2007. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatologica Portuguesa*, 32, 2: 103–110. [https://doi.org/10.1016/s0169-6009\(08\)80210-3](https://doi.org/10.1016/s0169-6009(08)80210-3).
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention., 2018. Health effects of cigarette smoking. https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/index.htm. (Accessed on October 22, 2022).
- Chapple, I.L.C., Mealey, B.L., Van Dyke, T.E., Bartold, P.M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M.L., Genco, R.J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T.J., Holmstrup, P., Johnson, G.K., Kapila, Y., Lang, N.P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G.A., Shapira, L., Tatakis, D.N., Teughels, W., Trombelli, L., Walter, C., Wimmer, G., Xenoudi, P., Yoshie, H., 2018. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, S74–S84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>.
- Chen, Y., Guo, Q., Pan, X., Qin, L., Zhang, P., 2011. Smoking and impaired bone healing: will activation of cholinergic anti-inflammatory pathway be the bridge? *International Orthopaedics*, 35, 1267–1270. <https://doi.org/10.1007/s00264-011->

- 1243-5.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89, 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- FDA, 1980. HHS. Select Committee on GRAS substances (SCOGS). URL <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS&sort=Sortsubstance&order=ASC&startrow=1&type=basic&search=propylene glycol> (Accessed on October, 22, 2022).
- Gleitz, J., Tosch, C., Peters, T., 1996. Continuous enzyme-linked fluorometric detection of L-(+)-lactate released from rat brain vesicles under anoxic conditions. *Journal of Neuroscience. Methods* 67, 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00006-4).
- Harvanko, A., Kryscio, R., Martin, C., Kelly, T., 2019. Stimulus effects of propylene glycol and vegetable glycerin in electronic cigarette liquids. *Drug and Alcohol Dependence*, 194, 326–329. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.08.039>.
- Javed, F., Rahman, I., Romanos, G.E., 2019. Tobacco-product usage as a risk factor for dental implants. *Periodontology* 2000, 81, 48–56. <https://doi.org/10.1111/prd.12282>.
- Kim, S.A., Smith, S., Beauchamp, C., Song, Y., Chiang, M., Giuseppetti, A., Frukhtbeyn, S., Shaffer, I., Wilhide, J., Routkevitch, D., Ondov, J.M., Kim, J.J., 2018. Cariogenic potential of sweet flavors in electronic-cigarette liquids. *PLoS One*, 13, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203717>.
- Melo, J.B., Agostinho, P., Oliveira, C.R., 2002. Amyloid beta-peptide 25-35 reduces [3H]acetylcholine release in retinal neurons. Involvement of metabolic dysfunction. *Amyloid Journal of Protein Folding Disorders*, 9, 221–228. <https://doi.org/10.3109/13506120209114097>.
- Onor, I.O., Stirling, D.L., Williams, S.R., Bediako, D., Borghol, A., Harris, M.B., Darensburg, T.B., Clay, S.D., Okpechi, S.C., Sarpong, D.F., 2017. Clinical Effects of Cigarette Smoking: Epidemiologic Impact and Review of Pharmacotherapy Options. *International Journal Environmental Research Public Health*, 14, 1147. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101147>.
- Otero, C.E., Noeker, J.A., Brown, M.M., Wavreil, F.D.M., Harvey, W.A., Mitchell, K.A., Heggland, S.J., 2019. Electronic cigarette liquid exposure induces flavor-dependent osteotoxicity and increases expression of a key bone marker, collagen type I. *Journal of Applied Toxicology*, 39, 888–898. <https://doi.org/10.1002/jat.3777>.
- Ramôa, C.P., Eissenberg, T., Sahingur, S.E., 2017. Increasing popularity of waterpipe tobacco smoking and electronic cigarette use: Implications for oral healthcare. *Journal Periodontal Research*, 52, 813–823. <https://doi.org/10.1111/jre.12458>.
- Rouabhia, M., Alanazi, H., Park, H.J., Gonçalves, R.B., 2019. Cigarette smoke and e-cigarette vapor dysregulate osteoblast interaction with titanium dental implant surface. *Journal of Oral Implantology*, 45, 2–11. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-18-00009>.
- Rouabhia, M., Park, H.J., Semlali, A., Zakrzewski, A., Chmielewski, W., Chakir, J., 2017. E-Cigarette Vapor Induces an Apoptotic Response in Human Gingival Epithelial Cells Through the Caspase-3 Pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 232, 1539–1547. <https://doi.org/10.1002/jcp.25677>.
- Rouabhia, M., Semlali, A., 2021. Electronic cigarette vapor increases *Streptococcus*

- mutans growth, adhesion, biofilm formation, and expression of the biofilm-associated genes. *Oral Diseases*, 27, 639–647. <https://doi.org/10.1111/odi.13564>.
- Rowell, T.R., Reeber, S.L., Lee, S.L., Harris, R.A., Nethery, R.C., Herring, A.H., Glish, G.L., Tarran, R., 2017. Flavored e-cigarette liquids reduce proliferation and viability in the CALU3 airway epithelial cell line. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313, L52–L66. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00392.2016>.
- Salasznyk, R.M., Klees, R.F., Williams, W.A., Boskey, A., Plopper, G.E., 2007. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 313, 22–37. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.09.013>.
- Sassano, M.F., Davis, E.S., Keating, J.E., Zorn, B.T., Kochar, T.K., Wolfgang, M.C., Glish, G.L., Tarran, R., 2018. Evaluation of e-liquid toxicity using an open-source high-throughput screening assay. *PLOS Biology*, 16 (3), e2003904. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003904>.
- Scolaro, J.A., Schenker, M.L., Yannascoli, S., Baldwin, K., Mehta, S., Ahn, J., 2014. Cigarette smoking increases complications following fracture: A systematic review. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 96, 674–681. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00081>.
- Shaito, A., Saliba, J., Husari, A., El-Harakeh, M., Chhour, H., Hashem, Y., Shihadeh, A., El-Sabban, M., 2017. Electronic Cigarette Smoke Impairs Normal Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Scientific Reports*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14634-z>.
- Tazi, N., Zhang, Z., Messaddeq, Y., Almeida-Lopes, L., Zanardi, L.M., Levinson, D., Rouabhia, M., 2012. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. *AMB Express*, 2, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-61>.
- U. S. Department of Health and Human Services, 2014. *The Health Consequences of Smoking: 50 Years of Progress. A Report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health.
- Wavreil, F.D.M., Hegglund, S.J., 2020. Cinnamon-flavored electronic cigarette liquids and aerosols induce oxidative stress in human osteoblast-like MG-63 cells. *Toxicology Reports*, 7, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.019>.
- Welz, C., Canis, M., Schwenk-Zieger, S., Becker, S., Stucke, V., Ihler, F., Baumeister, P., 2016. Cytotoxic and genotoxic effects of electronic cigarette liquids on human mucosal tissue cultures of the oropharynx. *Journal Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 35, 343–354. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016016652>.

3 CONCLUSÃO

O presente estudo *in vitro* demonstra que o grau de viabilidade e de citotoxicidade celular está relacionado à concentração do e-líquido, ou seja, quanto maior a concentração da substância líquida presente no líquido do cigarro eletrônico, maior é o dano causado nos osteoblastos.

A adesão celular é de fundamental importância para o adequado desenvolvimento e manutenção dos tecidos, e os resultados mostraram que a adesão celular foi bastante comprometida quando em altas concentrações do e-líquido, sobretudo na presença de uma concentração elevada de nicotina (18 mg/mL).

Assim como o presente estudo aponta efeitos danosos potenciais do cigarro eletrônico às células ósseas, os quais poderiam levar ao comprometimento dos processos de remodelação e regeneração óssea, deve-se levar em consideração que pela falta de padronização dos e-líquidos pode haver interferência na avaliação desses resultados e sua aplicabilidade clínica.

Estudos futuros que analisem a capacidade de colocar células remanescentes viáveis em cultura novamente, assim como avaliem a função de formação de nódulos ósseos e função de mineralização dos osteoblastos poderão fornecer uma visão sobre a conexão da ação dos cigarros eletrônicos e a deficiência funcional dos osteoblastos, podendo fornecer uma vinculação com doenças periodontais e disfunções ósseas.

4 REFERÊNCIAS

ALANAZI, Humidah *et al.* Comparative study of the effects of cigarette smoke and electronic cigarettes on human gingival fibroblast proliferation, migration and apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 118, n. April, p. 390–398, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.049>.

ALMEIDA-DA-SILVA, Cássio Luiz Coutinho *et al.* Effects of electronic cigarette aerosol exposure on oral and systemic health. **Biomedical Journal**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 252–259, 2021.

BEKLEN, A.; UCKAN, D. Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. **Human and Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 25–34, 2021.

BENOWITZ, Neal L; HUKKANEN, Janne; JACOB, Peyton. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *In*: HENNINGFIELD, Jack E; LONDON, Edythe D; POGUN, Sakire (org.). **Nicotine Psychopharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 29–60. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2.

BETHESDA, MD. Smoking and Bone Health. **National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center**, [s. l.], ano 18–7883, n. December, 2018. p. 1–6. Disponível em: <https://www.bones.nih.gov/health-info/bone/osteoporosis/conditions-behaviors/bone-smoking>.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Health effects of cigarette smoking**. [S. l.], 2018. Disponível em: https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/index.htm.

CHRCANOVIC, Bruno Ramos; ALBREKTSSON, Tomas; WENNERBERG, Ann. Smoking and dental implants: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 487–498, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.003>.

CTADS. **Canadian Tobacco, Alcohol and Drugs Survey (CTADS)**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/canadian-alcohol-drugs-survey/2017-summary.html>.

FIGUEREDO, Carlos Alberto *et al.* The impact of vaping on periodontitis: A systematic review. **Clinical and Experimental Dental Research**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 376–384, 2021.

GRANA, Rachel; BENOWITZ, Neal; GLANTZ, Stanton A. E-cigarettes: A scientific review. **Circulation**, [s. l.], v. 129, n. 19, p. 1972–1986, 2014.

JAVED, Fawad; RAHMAN, Irfan; ROMANOS, Georgios E. Tobacco-product usage as a risk factor for dental implants. **Periodontology 2000**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 48–56, 2019.

JEON, WONJEONG; CHOI, DONG-WOO; LEE, HYEON JI; LEE, SANG AH; PARK, EUN-CHEOL; JANG, Sung-In. Associations of Electronic and Conventional Cigarette Use with Periodontal Disease in South Korean Adults. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 55–64, 2019.

KIM, Shin Ae *et al.* Cariogenic potential of sweet flavors in electronic-cigarette liquids. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1–22, 2018.

LU, Yi *et al.* Cigarette smoke-associated inflammation impairs bone remodeling through NFκB activation. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–16, 2021.

MOMBELLI, Andrea; MÜLLER, Nada; CIONCA, Norbert. The epidemiology of peri-implantitis. **Clinical Oral Implants Research**, [s. l.], v. 23, n. SUPPL.6, p. 67–76, 2012.

NASERI, Roohollah; YAGHINI, Jaber; FEIZI, Awat. Levels of smoking and dental implants failure: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 518–528, 2020.

OTERO, Claire E. *et al.* Electronic cigarette liquid exposure induces flavor-dependent osteotoxicity and increases expression of a key bone marker, collagen type I. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 888–898, 2019.

ROUABHIA, Mahmoud *et al.* Cigarette smoke and e-cigarette vapor dysregulate osteoblast interaction with titanium dental implant surface. **Journal of Oral Implantology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 2–11, 2019.

ROUABHIA, Mahmoud *et al.* E-Cigarette Vapor Induces an Apoptotic Response in Human Gingival Epithelial Cells Through the Caspase-3 Pathway. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 232, n. 6, p. 1539–1547, 2017.

ROUABHIA, Mahmoud. Impact of Electronic Cigarettes on Oral Health: a Review. **Journal (Canadian Dental Association)**, [s. l.], v. 86, p. k7, 2020.

ROUABHIA, Mahmoud; SEMLALI, Abdelhabib. Electronic cigarette vapor increases *Streptococcus mutans* growth, adhesion, biofilm formation, and expression of the biofilm-associated genes. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 639–647, 2021.

SCOLARO, John A. *et al.* Cigarette smoking increases complications following fracture: A systematic review. **Journal of Bone and Joint Surgery**, [s. l.], v. 96, n. 8, p. 674–681, 2014.

TAZI, Neftaha *et al.* Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. **AMB Express**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–10, 2012.

U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. **A Report of the Surgeon General**, [s. l.], p. 1081, 2014.

WAVREIL, Florence D.M.; HEGGLAND, Sara J. Cinnamon-flavored electronic cigarette liquids and aerosols induce oxidative stress in human osteoblast-like MG-63 cells. **Toxicology Reports**, [s. l.], v. 7, n. July, p. 23–29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.019>.