

## A expressão de Cbfa1 nas células do músculo liso vascular pode ser elevada pelo aumento do óxido nítrico/iNOS

Cbfa1 expression in vascular smooth muscle cells may be elevated by increased nitric oxide/iNOS

### Autores

Maria Aparecida da Gloria<sup>1</sup> 

Margaret Gori Mouro<sup>1</sup> 

Simone Geraldini<sup>1</sup> 

Elisa Mieko Suemitsu Higa<sup>1,2</sup> 

Aluizio Barbosa Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, Programa de pós-graduação em Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, Programa de pós-graduação em Medicina Translacional, São Paulo, Brasil.

### RESUMO

**Introdução:** A calcificação vascular é uma complicação comum da doença renal crônica. O fator de diferenciação osteoblástica (Cbfa1) está presente em cortes histológicos das artérias de pacientes com doença renal em estágio terminal. As células do músculo liso vascular (CMLV) podem desdiferenciar para células do tipo osteoblastos, possivelmente pela regulação positiva da Cbfa1. Há evidências de que a produção de óxido nítrico (NO) pode ter um papel importante na regulação do metabolismo dos osteoblastos. O objetivo deste estudo é avaliar se o aumento da expressão de NO/iNOS causa um aumento na expressão de cbfa1 nas CMLV. **Métodos:** As CMLV foram obtidas da artéria renal de ratos machos Wistar, tratados por 72 horas com lipopolissacarídeo (LPS), β-glicerofosfato (BGF), um doador de fosfato e aminoguanidina (AG), um inibidor da iNOS, nos seguintes grupos: CTL (controle), LPS, BGF, LPS + BGF e LPS + AG. A síntese de NO foi determinada por quimioluminescência. As expressões de mRNA de Cbfa1 e iNOS foram analisadas por RT-PCR, a expressão da proteína Cbfa1 por imunohistoquímica e viabilidade celular por laranja de acridina. **Resultados:** As expressões de mRNA de Cbfa1 e iNOS foram maiores em LPS e LPS + BGF v.s. CTL ( $p < 0,05$ ) e menores em LPS + AG v.s. LPS ( $p < 0,05$ ). O Cbfa1 nos grupos LPS e LPS + BGF também resultou em um valor maior em comparação ao CTL ( $p < 0,05$ ), e no LPS + AG foi menor em comparação ao LPS ( $p < 0,05$ ). NO foi maior no LPS e LPS + BGF em comparação ao grupo CTL ( $p < 0,05$ ) e menor no LPS + AG em comparação ao grupo LPS ( $p < 0,05$ ). A viabilidade celular não mostrou diferença estatística entre os grupos. **Conclusão:** Este estudo mostrou que o aumento da expressão de NO/iNOS causa um aumento na expressão de cbfa1 nas CMLV.

**Palavras-chave:** Fatores de Ligação ao Core; Nefropatias; Miócitos de Músculo Liso; Óxido Nítrico Sintase.

### ABSTRACT

**Introduction:** Vascular calcification is a common complication of chronic kidney disease. Osteoblast differentiation factor (Cbfa1) is present in histologic sections of arteries from patients with end-stage renal disease. Vascular smooth muscle cells (VSMC) can dedifferentiate to osteoblast-like cells, possibly by up-regulation of Cbfa1. There is evidence that the production of nitric oxide (NO) may have an important role in the regulation of osteoblast metabolism. The aim of this study is to evaluate whether increased NO/iNOS expression causes an increase in cbfa1 expression in VSMC. **Methods:** VSMC were obtained from renal artery of Wistar male rats, treated for 72 hours with lipopolysaccharide (LPS), β-glycerophosphate (BGF), a donor of phosphate and aminoguanidine (AG), an inhibitor of iNOS, in the following groups: CTL (control), LPS, BGF, LPS + BGF, and LPS + AG. NO synthesis was determined by chemiluminescence. Cbfa1 and iNOS mRNA expressions were analyzed by RT-PCR, Cbfa1 protein expression by immunohistochemistry and cellular viability by acridine orange. **Results:** Cbfa1 and iNOS mRNA expressions were higher in LPS and LPS+ BGF vs CTL ( $p < 0.05$ ), and they were lower in LPS+AG vs LPS ( $p < 0.05$ ). The Cbfa1 in the groups LPS and LPS+BGF also resulted in a higher value compared to CTL ( $p < 0.05$ ), and in LPS+AG it was lower compared to LPS ( $p < 0.05$ ). NO was higher in LPS and LPS+BGF compared to CTL group ( $p < 0.05$ ) and lower in LPS + AG compared to LPS group ( $p < 0.05$ ). Cellular viability showed no statistical difference among groups. **Conclusion:** This study showed that increased NO/iNOS expression causes an increase in cbfa1 expression in VSMC.

**Keywords:** Core Binding Factors; Kidney diseases; Myocytes, Smooth Muscle; Nitric Oxide Synthase.

Data de submissão: 01/11/2019.

Data de aprovação: 14/03/2020.

### Correspondência para:

Maria Aparecida da Gloria.  
E-mail: gloria77795@gmail.com

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2019-0166



## INTRODUÇÃO

A patogênese da calcificação vascular não é completamente compreendida na prática clínica. Portanto, compreender os mecanismos reguladores que controlam essa calcificação é essencial para explorar alvos terapêuticos para possíveis aplicações clínicas.

As células musculares lisas vasculares (CMLV) são os componentes celulares da parede normal dos vasos sanguíneos, que fornecem integridade estrutural e regula o diâmetro dos vasos, contraindo e relaxando dinamicamente em resposta a estímulos vasoativos<sup>1</sup>.

A calcificação vascular é um processo regulado ativamente semelhante à osteogênese, no qual proteínas associadas aos ossos podem estar envolvidas. O fator de diferenciação dos osteoblastos (Cbfa1) é um fator crítico para os osteoblastos, e acredita-se que a expressão das proteínas da matriz óssea seja a chave que transforma a célula mesenquimal em uma célula do tipo osteoblastos e, portanto, leva à calcificação do VSMC<sup>2,3</sup>.

Estudos demonstraram que o Cbfa1 controla a expressão de osteopontina, colágeno tipo I e osteocalcina nos osteoblastos e tem sido associada a uma calcificação exagerada observada em células do músculo liso cultivadas<sup>4</sup>. Essas células mineralizam na presença de  $\alpha$ -glicerofosfato (BGF), um doador de fosfato, com regulação positiva de Cbfa1<sup>5</sup>.

Anormalidades no metabolismo mineral, em particular a hiperfosfatemia, frequentemente observada na doença renal crônica, emergiram como um regulador-chave da calcificação vascular e foram considerados fatores de risco para mortalidade cardiovascular nessa população<sup>6,7</sup>. O NO é uma molécula de sinalização celular com múltiplos papéis, incluindo a regulação dos tónus vascular e da neurotransmissão<sup>8,9</sup>. O NO é produzido pela maioria das células do corpo e seu substrato é a L-arginina, que sob o efeito da óxido nítrico sintase (NOS) gera L-citrulina e NO<sup>10</sup>. O NO sintetizado pelas células endoteliais é crucial para manter a saúde vascular e prevenir o desenvolvimento de doenças vasculares<sup>11</sup>. A NOS apresenta duas isoformas: a constitutiva (cNOS) e a induzível (iNOS); este último pode ser induzido por agentes como lipopolissacarídeo (LPS) de várias bactérias e inibido pela aminoguanidina (AG)<sup>12</sup>. A expressão da NOS foi detectada *in vivo* e *in vitro* na linhagem celular osteoblástica<sup>13</sup> e há evidências de que a produção de NO pode ter um papel importante na regulação do metabolismo dos osteoblastos<sup>14</sup>.

Estudos sobre o efeito do NO na função osteoblástica não são claros. Alguns pesquisadores mostraram que os doadores de NO aumentam a produção de cGMP e a atividade da fosfatase alcalina, e induzem a formação de nódulos ósseos *in vitro*<sup>15,16</sup>. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o aumento da produção de NO pela iNOS afeta a expressão de Cbfa1 nas CMLV da artéria renal do rato.

## MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética Animal.

### CULTURA CMLV

Ratos machos Wistar pesando 250 a 300g foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por injeção intraperitoneal. Os rins foram isolados através de uma incisão abdominal e as artérias renais foram removidas e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foi utilizada a técnica de explante para cultura primária de células musculares lisas. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com NaHCO<sub>3</sub> (2 g/L), Hepes (2,6 g/L) e penicilina (10.000 U/L) suplementada com 20% de soro fetal bovino (FBS) e incubados em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a primeira passagem, foi utilizado DMEM com 10% de FBS.

As células foram utilizadas nas experiências entre a terceira e a décima passagem e foram tratadas durante 72 horas<sup>17</sup>, de acordo com os seguintes grupos experimentais: controle de CTL (DMEM 10%); LPS (DMEM 10% + LPS 100 µg/mL); BGF (DMEM 10% + BGF12 mM); LPS + BGF (DMEM 10% + LPS + BGF); e LPS + AG (DMEM 10% + LPS + AG 30 mM).

Após 72 horas, os meios de cultura de células foram coletados e armazenados a -20°C para determinação do óxido nítrico. As células foram lisadas com dodecilsulfato de sódio a 2% (SDS) para determinação da proteína.

### CURVA DOSE-RESPOSTA

Um grupo distinto de células foi tratado por 72 horas com LPS (50, 100, 200 ou 300 µg/mL). A curva de resposta à dose da NOS foi obtida pela medição do NO no meio de cultura e nas expressões de iNOS e mRNA de Cbfa1.

## DETERMINAÇÃO NO

O NO foi determinado no meio de cultura de células pelo método de quimioluminescência<sup>17</sup>. Utilizamos o Analisador de Óxido Nítrico Modelo 280 (NOATM) da Sievers Instruments, Inc. (Boulder, CO, EUA), um detector de alta sensibilidade para medir óxido nítrico, com base em uma reação quimioluminescente em fase gasosa entre óxido nítrico e ozônio:  $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$   $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2$ . A emissão do dióxido de nitrogênio eletricamente excitado está na região vermelha e no infravermelho próximo do espectro, e é detectada por um tubo fotomultiplicador sensível ao vermelho, resfriado termoeletricamente. A sensibilidade para a medição do NO e seus produtos de reação em amostras líquidas é de  $\pm 1$  picomol.

## VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo corante fluorescente laranja de acridina e brometo de etídio. Após as células terem sido tripsinizadas, uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  de suspensão de células foi incubada com 0,3  $\mu\text{L}$  de solução de acridina laranja/brometo de etídio (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de cada corante). A laranja de acridina é permeável às células e liga-se ao DNA de fita dupla que emite uma fluorescência verde (excitação 502 nm e emissão de 525 nm) ou RNA de fita simples que emite uma fluorescência laranja avermelhada (excitação 460 nm e emissão de 650 nm). Em contraste, o brometo de etídio se liga apenas ao DNA de fita dupla e também emite uma fluorescência vermelha (excitação 510 nm e emissão 595 nm); no entanto, a célula não é permeável ao corante quando a membrana plasmática está intacta e, portanto, apenas as células necróticas o absorvem (com a fluorescência vermelha anulando o verde/laranja do laranja acridina). As suspensões celulares foram observadas sob um microscópio fluorescente com ampliação de 40X e foram contadas 200 células de vários campos microscópicos. As células que emitem uma fluorescência verde foram consideradas viáveis, enquanto as que emitem uma fluorescência vermelha foram consideradas inviáveis. As células viáveis foram relatadas como porcentagem do total de células contadas.

## REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) DE iNOS E CBFA1

O RNA total foi extraído das células cultivadas pelo método TRIZOL®. O RNA resultante foi usado para

gerar o fragmento de cDNA correspondente ao iNOS por amplificação por RT-PCR usando os iniciadores para iNOS (464 pb): 5'-CCG GAT CCT CTT TGC TAC TGA GGA AGG-3' e 5'-CCG AAT TCG GGA TCT GAA TGC AAT GTT-3'. Os parâmetros de ciclagem foram iniciados a quente a 95 °C por 3 minutos; seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 30 segundos; 72 °C por 7 minutos e 4 °C. Os iniciadores para Cbfa-1 (111 pb): 5'-CCT CAC TGA GAG CCG CTT CT-3' e 5'-GTA GTG AGT GGT GGC GGA GGC CAT-3' foram iniciados a quente a 95 °C por 3 minutos; seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 45 segundos; 56 °C por 45 segundos; 72 °C por 45 segundos; 72 °C por 10 minutos e 4 °C. Os produtos de RT-PCR foram envolvidos em gel de agarose a 3% e visualizados por coloração com EB. Finalmente, uma figura foi obtida pelo Sistema de Documentação e Análise de Eletroforese Kodak (EDAS), modelo DC120, EUA, utilizando um filtro de brometo de etídio, acoplado a um transiluminador UV. A densidade da banda foi analisada por densitometria de varredura utilizando o software image Quant 4.0 (Storm) (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EUA). A estimativa semi-quantitativa de RNA foi realizada com  $\beta$ -actina (191pb) para controle. Os resultados são relatados como a razão de unidades arbitrárias das densidades da banda.

## IMUNOHISTOQUÍMICA - CBFA1

Uma suspensão de células (3x10<sup>5</sup> células/mL) foi usada para as preparações em camada fina com a centrífuga Cytospin (Shandon, Pittsburgh, PA EUA). As preparações foram fixadas em acetona e lavadas em PBS. As células foram incubadas em uma câmara úmida escura à temperatura ambiente por 2 horas, com anticorpo policlonal de cabra contra Cbfa1 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA, diluição 1/100). Após lavagens em PBS, as células foram tratadas com o anticorpo secundário e o complexo estreptovidina-biotina-peroxidase de acordo com os fabricantes do LSAB (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). A hematoxilina foi usada para contra-manter os núcleos. As células imunorreativas mostraram citoplasma de coloração marrom escuro. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica convencional (Leica DM1000, Suíça). A quantificação foi realizada por um microsistema de programa de quantificação automatizado (Leica LAS V3.8, câmera DFC310 FX).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparar a síntese de NO e a imunocitoquímica entre os grupos, foi utilizada a análise de variância unidirecional (ANOVA). A RT-PCR foi quantificada por densitometria, e a diferença nas razões Cbfa1/ $\beta$ -actina e iNOS/ $\beta$ -actina entre os grupos foi comparada por ANOVA com o teste post-hoc de Tukey. A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Todos os grupos apresentaram viabilidade celular semelhante ao CTL ( $96,3 \pm 2,1\%$ ) ( $p > 0,05$ ): LPS controle ( $96,9 \pm 2,5\%$ ), LPS + AG ( $93,5 \pm 5,1\%$ ), LPS + BGF ( $95,3 \pm 2,6\%$ ) e BGF ( $96,2 \pm 3,7\%$ ).

A curva dose-resposta de LPS na síntese de NO é mostrada na Tabela 1. A síntese de NO foi maior em todos os grupos em comparação com o LPS 50 ( $p < 0,05$ ).

A Figura 1 mostra os resultados da síntese de NO (nmol/mg de proteína) por CMLV nos grupos: CTL, LPS, LPS + AG, LPS + BGF e BGF. Comparando com o grupo CTL, a síntese de NO aumentou no LPS ( $118,9 \pm 11,6$  v.s.  $75,6 \pm 5,1$ ;  $p < 0,05$ ) e diminuiu nos grupos LPS + AG e BGF ( $31,8 \pm 1,5$  e  $53,0 \pm 3,9$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ). Comparado ao LPS, a síntese de NO diminuiu em LPS + AG ( $31,8 \pm 1,5$ ;  $p < 0,05$ ) e no BGF ( $53,03 \pm 3,9$ ;  $p < 0,05$ ). A síntese de NO no grupo LPS + BGF ( $93,4 \pm 15,7$ ) aumentou quando comparada ao grupo controle e diminuiu quando comparada ao grupo LPS, embora não tenha sido encontrada significância estatística.

A Figura 2 mostra a imagem em gel representativa da curva de resposta à dose de LPS nas expressões de mRNA de Cbfa1 e iNOS a 50, 100 ou 200  $\mu$ g/mL. A análise densitométrica de Cbfa1/ $\beta$ -actina mostrou valores mais baixos com LPS 50 ( $0,20 \pm 0,10$ ) em comparação com LPS 100 ( $0,36 \pm 0,06$ ) ou LPS 200 ( $0,39$

$\pm 0,11$ ) ( $p < 0,05$ ), e iNOS/ $\beta$ -actina mostrou menor valores com LPS 50 ( $0,35 \pm 0,05$ ) em comparação com LPS 100 ( $0,63 \pm 0,12$ ) ou LPS 200 ( $0,95 \pm 0,19$ ) ( $p < 0,05$ ).

A Figura 3 mostra a imagem em gel representativa (A) e a quantificação densitométrica (B) do mRNA de Cbfa1 ou iNOS nos grupos CTL, LPS, LPS + AG, LPS + BGF ou BGF. Nas células tratadas com LPS ou LPS + BGF, foi detectada a expressão do RNAm do iNOS ( $0,90 \pm 0,13$  e  $0,89 \pm 0,23$ , respectivamente), enquanto nos CTL e nos grupos tratados com LPS + AG ou BGF não houve expressão do RNAm do iNOS. Houve uma superexpressão do mRNA de Cbfa1 em rCMLV tratadas com LPS ( $0,45 \pm 0,09$ ) ou LPS + BGF ( $0,48 \pm 0,07$ ) quando comparado ao controle ( $0,20 \pm 0,04$ ;  $p < 0,05$ , para ambos), enquanto naqueles tratados com LPS + AG ( $0,14 \pm 0,04$ ) a expressão de mRNA de Cbfa1 foi menor quando comparada ao grupo LPS ( $p < 0,05$ ).

A Figura 4 mostra a imagem em gel representativa da resposta à dose de AG no mRNA de Cbfa1 ou iNOS, em células tratadas com LPS 100  $\mu$ g/mL. Quanto à expressão do mRNA de Cbfa1, não foi observada diferença nas doses de 5, 10 ou 20 mM de AG quando comparado ao LPS sozinho. A expressão de mRNA de Cbfa1 na dose de 30 mM de AG ( $0,11 \pm 0,04$ ) foi menor em comparação com o LPS sozinho ( $0,56 \pm 0,09$ ) ( $p < 0,05$ ). A expressão do RNAm da iNOS também foi menor em 30 mM de AG ( $0,47 \pm 0,06$ ) quando comparado apenas com o LPS ( $p < 0,05$ ).

A Figura 5 mostra as imagens da expressão da proteína Cbfa1 nos grupos CTL (A); BGF (B); LPS (C) e LPS + AG (D).

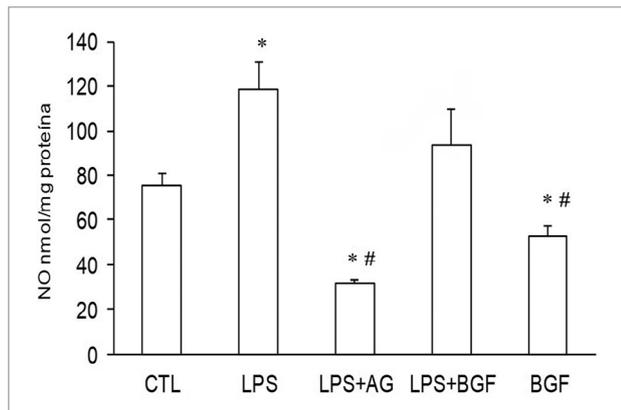
A Figura 6 mostra a porcentagem de área manchada de Cbfa1. A expressão de Cbfa1 aumentou no grupo LPS quando comparado ao grupo CTL ( $15,64 \pm 1,16$  v.s.  $1,36 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ), e no grupo LPS + AG diminuiu quando comparado ao LPS ( $5,25 \pm 0,44$  v.s.  $15,64 \pm 1,16$ ;  $p < 0,05$ ).

**TABELA 1** CURVA DOSE-RESPOSTA DA SÍNTESE DE NO (NMOL/MG DE PROTEÍNA) NAS CMLV EXPOSTAS A LPS (50, 100, 200 OU 300  $\mu$ g/mL) POR 72 HORAS

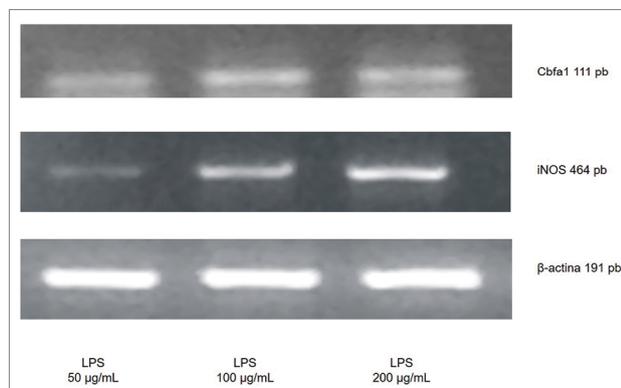
Grupo	LPS	LPS	LPS	LPS
	50 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	300 $\mu$ g/mL
	$51.8 \pm 3.8$	$104.5 \pm 22.0^a$	$123.9 \pm 12.3^a$	$197.9 \pm 44.1^a$

Média  $\pm$  EPM, análise de variância one-way (ANOVA); <sup>a</sup>  $p < 0.05$  v.s. LPS 50  $\mu$ g/mL

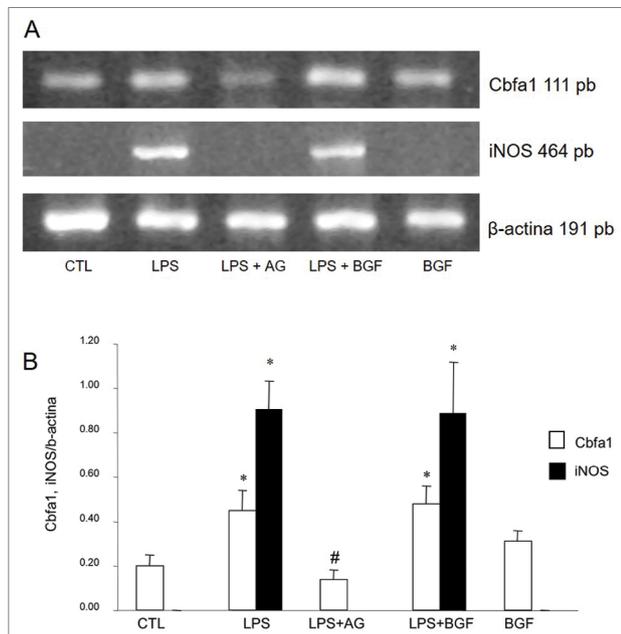
**Figura 1.** Síntese de NO em CMLV cultivadas e tratadas com LPS (100 µg/mL), LPS + AG (30 mM), BGF (12 mM) ou LPS + BGF (12mM), analisados pelo método de quimioluminescência. Média ± EPM (N = 5 para todos os grupos). \* p < 0,05 v.s. controle (CTL); # p < 0,05 v.s. LPS.



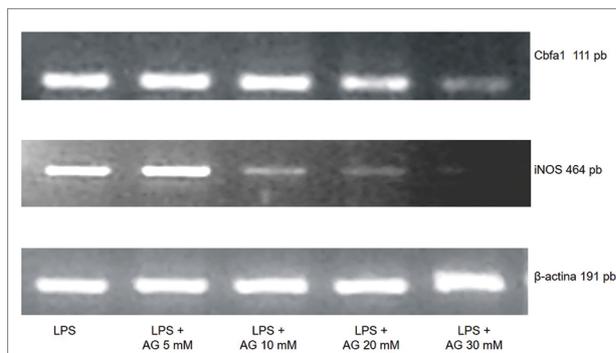
**Figura 2.** Resposta à dose de LPS (50, 100 ou 200 µg/mL) na expressão de mRNA de Cbfa1 ou iNOS em CMLV. Produtos representativos de amplificação por RT-PCR utilizando os iniciadores para Cbfa1, iNOS ou β-actina.



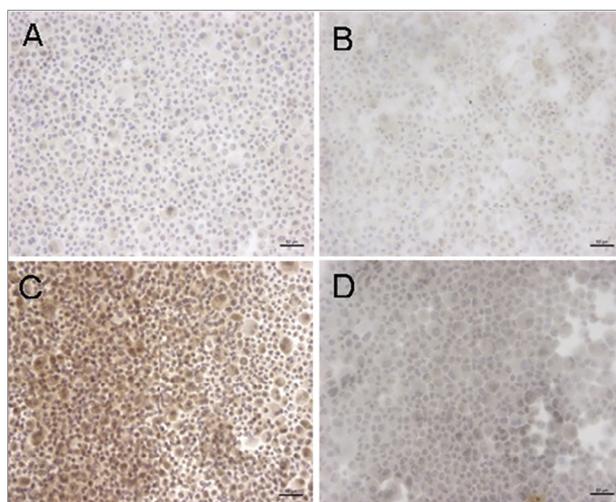
**Figura 3.** Efeitos de LPS (100 µg/mL), LPS + AG (30 mM), LPS + BGF (12 mM) ou BGF (12 mM) na expressão de Cbfa1 e iNOS. (A) Produtos representativos de amplificação por RT-PCR utilizando os iniciadores para Cbfa1, isoforma iNOS ou β-actina. (B) Análise densitométrica de Cbfa1/β-actina ou iNOS/β-actina. \*p < 0,05 v.s. CTL, #p < 0,05 v.s. LPS.



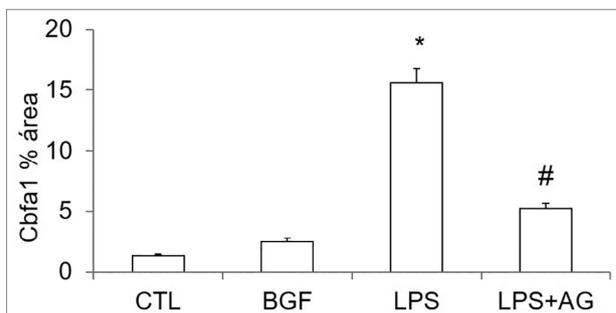
**Figura 4.** Resposta à dose de AG (5, 10, 20 e 30 mM) nas expressões de mRNA de Cbfa-1 ou iNOS após 72 horas de tratamento com LPS (100 µg/mL) em CMLV cultivadas. Produtos representativos de amplificação por RT-PCR utilizando os iniciadores para Cbfa1, isoforma iNOS ou β-actina.



**Figura 5.** Imunocitoquímica de Cbfa1. A-CTL, B-BGF (12 mM), C-LPS (100 µg/mL), D-LPS (100 µg/mL) + AG (30 mM).



**Figura 6.** Quantificação da imunocitoquímica. Área corada Cbfa1. \* p < 0,05 v.s. CTL; # p < 0,05 v.s. LPS.



## DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliadas expressões de RNAm e proteínas da síntese de Cbfa1, iNOS e NO em CMLV cultivadas. Descobrimos que a expressão de Cbfa1 aumentou com o crescimento na produção de NO devido ao aumento da expressão de iNOS.

A expressão de mRNA dos níveis de Cbfa1 e iNOS e NO foi maior em LPS e LPS + BGF e menor quando AG foi adicionado. As Cbfa1 analisadas por imunohistoquímica nos grupos LPS ou LPS + BGF foram maiores quando comparadas às CTL.

De acordo com a nossa curva de resposta à dose de NO nas CMLV tratadas com LPS (Tabela 1), foi observado um aumento progressivo da síntese de NO de LPS 50 para 300 µg/mL. A dose de 100 µg/mL foi utilizada, pois já foi demonstrado anteriormente que essa dosagem foi capaz de induzir a expressão da iNOS e aumentar a síntese de NO<sup>17</sup>.

A síntese de NO aumentou na presença de LPS e diminuiu quando AG foi adicionado; no entanto, na presença de BGF, não podemos explicar por que ocorreu uma diminuição na produção de NO. Além disso, até o momento, não existem dados na literatura sobre essa questão (Figura 1).

O LPS geralmente é capaz de induzir a expressão de iNOS e aumentar a produção de NO em 24 horas. No entanto, de acordo com Jono et al.<sup>2</sup>, 72 horas é o momento ideal para aumentar a expressão de Cbfa1 após a adição de BGF em CMLV cultivadas, mantendo a viabilidade celular. Além disso, os metabólitos do NO, nitritos e nitratos, ficam estáveis em 72 horas.

Na curva de resposta à dose do mRNA Cbfa1 e iNOS, houve um valor mais alto nas doses de 100 e 200 µg/mL após 72 horas, como mostra a Figura 2.

Nas Figuras 3A e 3B, observamos que o mRNA da iNOS estava superexpresso quando as células foram tratadas por LPS e foram inibidas pela AG. Em relação à expressão de Cbfa1, nossos resultados mostraram um comportamento semelhante, ou seja, uma superexpressão de Cbfa1 em células tratadas com LPS e uma inibição do gene quando AG foi adicionado à cultura. Se existe ou não um mecanismo direto que leve ao aumento da expressão de Cbfa1 por meio do iNOS, é necessário aprofundar a discussão.

As experiências realizadas em nosso laboratório com CMLV tratadas apenas com AG não mostraram diferença na expressão de Cbfa-1. A dose de 30 mM de AG foi escolhida por ser a dose ideal para inibir iNOS e Cbfa1 após 72 horas (Figura 4). Embora algumas investigações tenham utilizado a dose de AG em torno de 100 µM para inibir a expressão da NOS, os protocolos estabelecidos por outros estudos variaram de 10 a 100 mM<sup>18,19</sup>.

Alguns estudos investigaram a relação das isoformas NOS com Cbfa1 em células osteoblásticas<sup>20,21</sup>.

Sabe-se que tanto as células CMLV quanto os osteoblastos são da mesma origem mesenquimal<sup>22,23</sup>. Além disso, em alguns estados de doença, as CMLV podem se desdiferenciar em células do tipo osteoblastos, um mecanismo mediado por Cbfa1<sup>24</sup>. Jono et al.<sup>1</sup> demonstraram pela primeira vez que as CMLV mineralizam na presença de BGF a 12 mM, com regulação positiva de Cbfa1<sup>1</sup>. Por outro lado, Moe et al.<sup>4</sup> demonstraram que nas CMLV bovinas incubadas em soro urêmico de pacientes em hemodiálise, houve uma regulação positiva da Cbfa1 por meio de um mecanismo mediado sem fósforo, sugerindo que a etiologia da calcificação vascular em pacientes em diálise é multifatorial. Para testar os efeitos do fósforo na expressão de Cbfa1, adicionamos BGF às CMLV cultivadas. Diferentemente do estudo de Jono, não foi possível observar uma superexpressão de Cbfa1 após aumentar a concentração de fosfato. Não houve superexpressão do mRNA de Cbfa1 nas células após a adição de BGF e não pudemos observar uma superexpressão desse gene após o tratamento com LPS + BGF; essa superexpressão foi semelhante à do LPS isoladamente, confirmando a ausência de efeitos de BGF na Cbfa1.

A expressão da proteína Cbfa1 por imunohistoquímica foi maior na presença de LPS em comparação aos grupos CTL e BGF; e na presença de AG, foi menor em comparação ao grupo LPS, como mostrado nas Figuras 5 e 6.

Nossos resultados estão de acordo com os de Moe et al., mostrando que a expressão de Cbfa1 pelas CMLV pode ser induzida por um mecanismo não mediado por fósforo, entre outros<sup>4</sup>, como espécies reativas de oxigênio.

Embora o estresse oxidativo não tenha sido avaliado neste estudo, deve-se lembrar que as espécies reativas de nitrogênio atuam em conjunto com espécies reativas de oxigênio, danificando células e causando estresse nitrosativo<sup>8</sup>. Portanto, essas duas espécies são frequentemente referidas coletivamente e teriam que ser melhor avaliadas em estudos futuros.

Embora tenha havido um aumento na expressão de Cbfa1 após o aumento da expressão de NO/iNOS, não se pode dizer que foi devido a um caminho direto ou indireto. Para apoiar esta hipótese, novas investigações sobre mecanismos serão necessárias para uma melhor compreensão da complexa relação entre o sistema NO e a expressão do gene Cbfa1.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo mostrou que o aumento da expressão de NO/iNOS causa um aumento na expressão de cbfa1 nas CMLV cultivadas, indicando que o aumento da produção de NO pode participar da expressão de Cbfa1.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Maria Aparecida da Gloria: líder na conceituação, curadoria de dados, análise formal, aquisição de recursos, investigação, metodologia, administração de projetos, recursos e redação do rascunho original. Margaret Gori Mouro: apoio na metodologia. Simone Geraldini: apoio na redação, revisão e edição. Elisa Mieko Suemitsu Higa: apoio na supervisão. Aluizio Barbosa Carvalho: líder de supervisão.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse relacionado à publicação deste manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- Jono S, Mckee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori Katsuhito et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 2000; 87:e10-e17.
- Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J. Bone Miner. Metab.* 2006; 24:176-181.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89:747-754.
- Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor *Cbfa1* in human blood vessels. *Kidney Int.* 2003; 63:1003-1011.
- Wada T, Mckee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures- Inhibition by osteopontin. *Circ. Res.* 1999; 84:166-178.
- Giachelli CM, Speer MY, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification – Roles of phosphate and osteopontin. *Circ. Res.* 2005; 96:717-722.
- Róman-García P, Rodríguez-García M, Cabezas-Rodríguez I, López-Ongil S, Díaz-López B, Cannata-Andía JB. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis. *Med. Princ. Pract.* 2011; 20:203-212.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-142.
- Nathan C. Nitric oxide is secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6:3051-3064.
- Llorens S, Jórdan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the vascular system. *J. Physiol. Biochem.* 2002, 58:179-188.
- Yu X, Chen P, Wang H, Zhu T. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction in those with impaired glucose regulation among the first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. *Med. Princ. Pract.* 2013; 22:156-160.
- Weigert AL, Higa EM, Niederberger M, McMurtry IF, Reynolds M, Schrier RW. Expression and preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase in aortas of endotoxemic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995; 5:2067-2072.
- Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernández-Luna JL et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* 1995; 10:439-446.
- Hukkanen M, Hughes FJ, Buttery LD, Gross SS, Evans TJ, Seddon S et al. Cytokine-Stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology* 1995; 136:5445-5453.
- MacPherson H, Noble BS, Ralston SH. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. *Bone* 1999; 24:179-185.
- Mancine L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martinetti V, MacIntyre I. The Biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 274:477-481.
- Lessio C, Silva FA, Gloria MA, Di Tommaso AB, Gori Mouro M, Di Marco GS et al. Cyclosporine A and NAC on the inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide synthesis in rat renal artery cultured cells. *Kidney Int.* 2005; 68:2508-2516.
- Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato Hiroshi. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol. Reproduction* 2002; 67:1588-1592.
- Huo LJ, Liang CG, YU LZ, Zhong ZS, Yang ZM, Fan HY et al. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction* 2005; 129:403-409.
- Zaragoza C, López-Rivera E, García-Rama C, Saura M, Martínez-Ruiz A, Lizarbe TR et al. *Cbfa-1* mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts. *Journal of Cell Science* 2006; 119:1896-1902.
- Afza F, Polak J, Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J. Pathol.* 2004; 202:503-10.
- Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan editors. *Principles of bone biology*. San Diego, CA: Academic Press 1996; 51-67.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256:225-228.