



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Ilsione Ribeiro de Sousa Filho

Estudo bioquímico e imunohistoquímico da enzima conversora de angiotensina
e da quimase no fluido pericárdico e no pericárdio parietal bovino

Uberaba – MG
2011

ILSIONE RIBEIRO DE SOUSA FILHO

Estudo bioquímico e imunohistoquímico da enzima conversora de angiotensina e da quimase no fluido pericárdico e no pericárdio parietal bovino

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes

Uberaba – MG
2011

Dedico este trabalho àquelas pessoas importantes na minha vida e que contribuíram para mais esta conquista: Sandra, Ilsione, Pollyana e Jean Borges.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Roseli Aparecida da Silva Gomes, por acreditar na minha capacidade para desenvolver este trabalho e me inserir no ambiente científico.

À professora Maria Laura Pinto Rodrigues pelos ensinamentos, por me acompanhar durante todo o processo de desenvolvimento do trabalho tanto na parte experimental quanto na parte escrita, por permitir que eu a acompanhasse nas aulas da disciplina de Embriologia contribuindo com meu treinamento didático, pelas conversas e motivações, e, acima de tudo, pela amizade.

Às professoras Lívia das Graças Vieito Lombardi Teodoro e Élia Cláudia de Souza Almeida pelo auxílio na parte experimental.

Às alunas do laboratório Ana Carolina e Isabela pela amizade, pelo auxílio e por compartilhar as alegrias e frustrações dos experimentos.

Ao Lourimar por colaborar na obtenção das amostras e aos frigoríficos de Uberaba (Boi Bravo) e de Delta por permitir as coletas.

Às funcionárias da disciplina de Patologia Geral Liliane e Sônia por realizar os cortes histológicos.

À CAPES-REUNI pela bolsa de mestrado.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

RESUMO

O pericárdio de mamíferos consiste de uma membrana serosa e um saco fibroso. A serosa cobre a porção externa do coração (pericárdio visceral) e margeia a parte interna do saco fibroso (pericárdio parietal). Funções como transporte de fluido e partículas, participação em reações inflamatórias, reparo tecidual, proteção contra microrganismos e disseminação tumoral têm sido atribuídas a esta estrutura. O espaço entre o pericárdio visceral e parietal contém o fluido pericárdico que serve como um lubrificante e desempenha muitas funções locais. A composição deste fluido é considerada como um ultrafiltrado do plasma, enriquecido em moléculas como prostaglandinas, fator natriurético atrial, fatores de crescimento e angiotensina II (Ang II) entre outras. A visão clássica da Ang II como uma molécula vasoativa que participa da regulação hemodinâmica sistêmica e local tem se expandido. Este peptídeo, hoje em dia, é considerado como uma citocina, desempenhando funções na patologia cardiovascular, com efeitos pró-fibróticos e pró-inflamatórios. Estudos têm demonstrado que além da enzima conversora de angiotensina (ECA), outras enzimas são capazes de gerar Ang II, dentre elas a quimase, cujo principal sítio de produção e estocagem são os mastócitos. Assim, os objetivos deste trabalho foram demonstrar a presença tanto de ECA quanto de quimase no fluido pericárdico bovino, quantificar os mastócitos e imunolocalizar ambas as enzimas na membrana pericárdica de boi, verificando assim seus possíveis sítios de síntese. Os resultados obtidos permitiram a identificação de uma isoforma de ECA no fluido pericárdico, com massa molecular de aproximadamente 146 kDa, após a imunorreação sobre membrana de nitrocelulose. Nas secções de membrana pericárdica, a ECA foi identificada ao longo da camada mesotelial, sugerindo ser esta a fonte de produção de parte da ECA existente no fluido pericárdico. Em relação à quimase, enzima pertencente às vias alternativas para produção de Ang II, não foi possível detectar a presença desta enzima em amostras deste fluido. Através das reações histoquímicas, os mastócitos foram identificados e quantificados na membrana pericárdica. A densidade média foi de $43,77 \pm 14,73$ mastócitos/mm² por animal. Em relação à integridade destas células, a densidade de mastócitos degranulados foi maior que a densidade de mastócitos granulados, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Finalmente, a imunodeteção de quimase, através da microscopia de fluorescência, permitiu, pela primeira vez, a identificação de mastócitos quimase-positivos em secções de tecido bovino, embora em quantidade reduzida.

Palavras chave: Ang II, ECA, quimase, mastócitos, pericárdio parietal e fluido pericárdico.

ABSTRACT

The mammalia pericardium consists of a serous membrane and a fibrous sac. The serous covers the outside of the heart (pericardium visceral and lines the inside of the fibrous sac (parietal pericardium). The space among parietal and visceral pericardium contain the pericardial fluid wich serves as lubricant and play many local roles. The composition of this fluid is considered as an ultrafiltrate of plasma enriched in molecules, such as prostaglandins, atrial natriuretic factor, growth factors and angiotensin (Ang II). The classic vision of Ang II as vasoactive molecule that participates of systemic and local hemodynamic regulation has been expanded. This peptide nowadays is considered as a cytokine presents an active role in cardiovascular pathology with pro-fribrotic and pro-inflammatory effects. Studies demonstred that chymase is an alternative pathway of Ang II synthesis. The aims of this study was to show the presence of ACE and chymase in the bovine pericardial fluid, quantify the mast cells and identify the presence of both enzymes on the bovine parietal pericardium. The results obtained allowed the identification of an ACE isoform in the pericardial fluid weighing about 146 kDa, after immunoreaction on nitrocellulose membrane. In sections of the pericardial membrane, ACE has been identified along the mesothelial layer. It's suggesting this layer can be a source that produce part of the ACE in pericardial fluid. Regarding chymase, an enzyme of the alternative pathway of Ang II , has not been possible to detect the presence of this enzyme in samples of this fluid after immunoreaction on nitrocellulose membrane. Through histochemical reactions, mast cells were identified and quantified in the pericardial membrane. The average density was 43.77 ± 14.73 cells / mm² per animal. In relation to the integrity of these cells, the density of degranulated, median, mast cells was greater than the density of mast cell granules, and this difference was statistically significant. Finally, the immunodetection of chymase by fluorescence microscopy, allowed for the first time, the identification of chymase positive mast cells in sections of bovine tissues, although small amounts.

Key words: Ang II, ACE, chymase, mast cells, parietal pericardium and pericardial fluid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Gel de poliacrilamida-SDS e “ <i>western blot</i> ” para ECA..... | 27 |
| Figura 2. Gel de poliacrilamida-SDS do extrato bruto do líquido pericárdico, imunoprecipitado com anticorpo anti-quimase | 27 |
| Figura 3. Secções histológicas de membrana pericárdica parietal bovina | 28 |
| Figura 4. Número de mastócitos por mm ² no pericárdio parietal bovino..... | 30 |
| Figura 5. Número de mastócitos granulados e degranulados, por mm ² , no pericárdio parietal bovino | 30 |
| Figura 6. Microscopia de fluorescência de membrana pericárdica com anticorpo anti-quimase e anti-ECA | 32 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. Estrutura do pericárdio parietal de mamíferos..... | 10 |
| 1.2. Fluido pericárdico | 12 |
| 1.3. Vias de produção de angiotensina II..... | 13 |
| 1.3.1. Quimase | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Geral..... | 19 |
| 2.2 Específicos | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Coleta de membrana e líquido pericárdico | 20 |
| 3.2. Processamento do líquido pericárdico | 20 |
| 3.3. Imunoprecipitação | 20 |
| 3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)..... | 21 |
| 3.5. Transferência para membrana de nitrocelulose | 21 |
| 3.6. Imunoquímica em membranas de nitrocelulose | 22 |
| 3.7. Processamento da membrana pericárdica parietal | 22 |
| 3.8. Histoquímica para mastócitos | 23 |
| 3.9. Análises morfológica e morfométrica | 23 |
| 3.10. Imunohistoquímica | 23 |
| 3.11. Imunofluorescência..... | 24 |
| 3.12. Análise estatística | 25 |
| 4. RESULTADOS | 26 |
| 4.1. Detecção de ECA no líquido pericárdico | 26 |
| 4.2. Detecção de quimase no líquido pericárdico | 26 |
| 4.3. Identificação histoquímica dos mastócitos | 26 |
| 4.4. Quantificação dos mastócitos | 29 |
| 4.5. Imunolocalização de quimase na membrana pericárdica | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.6. Imunolocalização de ECA na membrana pericárdica..... | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 33 |
| 6. CONCLUSÕES | 38 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 39 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURA DO PERICÁRDIO PARIETAL DE MAMÍFEROS

A importância do pericárdio tem sido, nos últimos anos, cada vez mais investigada. Os primeiros estudos desta estrutura não lhe atribuíam nenhuma função essencial relacionada à manutenção das condições fisiológicas normais. Avanços nas pesquisas começaram a demonstrar papéis relevantes desempenhados pelo pericárdio tais como: prevenção da super dilatação do coração; proteção do coração contra infecções e adesão aos tecidos vizinhos; fixação do coração; e regulação do volume de ejeção dos ventrículos (BERGLUND, SARNOFF e ISAACS, 1955; HOLT, 1967 e 1970; HOLT, RHODE e KINES, 1960). Funções como transporte de fluido e partículas, participação em reações inflamatórias, reparo tecidual, proteção contra microrganismos invasores e disseminação tumoral também estão relacionadas a esta estrutura (revisado por MUTSAERS, 2002).

O pericárdio de mamíferos é composto por duas camadas: o pericárdio fibroso, mais externo, e o pericárdio seroso, mais interno. O pericárdio fibroso é uma estrutura composta por fibras colágenas e elásticas, fornecendo suporte mecânico às estruturas em torno do mediastino. Já o pericárdio seroso é constituído de um pericárdio visceral, também denominado de epicárdio, inseparável do coração, e de um pericárdio parietal, refletido sobre o coração. O pericárdio parietal representa a parede parietal externa, que faz face de um lado com o pericárdio fibroso e do outro com um compartimento extracelular que é a cavidade pericárdica ou espaço pericárdico, no interior da qual está contido o fluido pericárdico. As camadas serosa e fibrosa do pericárdio parietal, juntas, devem medir menos que 2 mm em indivíduos normais, sendo a camada fibrosa a de maior espessura. Os prolongamentos do pericárdio seroso formam dois tubos. Um tubo margeia as origens da aorta e tronco pulmonar, enquanto o outro margeia as origens da veia cava superior, veia cava inferior e veias pulmonares. A conexão desses tubos é feita através do seio transversal (HOLT, 1970).

O pericárdio parietal de mamíferos é composto por três camadas: a serosa, a fibrosa e uma camada mais externa de tecido conectivo epipericárdico. A primeira consiste de uma camada superficial de células mesoteliais (mesotélio) e de um estreito espaço submesotelial que separa as células mesoteliais da fibrosa, camada situada logo abaixo. A fibrosa é composta por células do tecido conectivo, como fibroblastos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, por pequenos vasos, por colágeno compactamente arranjado e por pequenas fibras elásticas. Por fim, a camada tecidual conectiva epipericárdica contém fibras

colágenas e elásticas, células adiposas, elementos neurais e vasos sanguíneos (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981).

A camada mesotelial é composta por uma única camada de células. O mesotélio margeia a superfície das cavidades serosas (pleural, pericárdica e peritoneal), e no homem, também reveste a túnica vaginal, nas regiões anterior e lateral do testículo. Embriologicamente, o mesotélio desenvolve-se do tecido mesodérmico entre 8º e 18º dias de gestação, dependendo da espécie. Em humanos, isto ocorre por volta do 14º dia, com a gradual diferenciação destas células, de redondas ou cubóides para células alongadas e achatadas (HESSELD AHL e LARSEN, 1969; TIEDEMANN, 1976). As células mesoteliais estão apoiadas sobre uma lâmina basal e apresentam diâmetro máximo sagital na área dos núcleos, freqüentemente posicionados ao centro. O citoplasma contém pequeno número de mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático bem desenvolvidos, bem como vesículas pinocíticas e vacúolos dispersos no citosol. Cílios e microvilos são observados na superfície das células mesoteliais. Estruturas juncionais intercelulares especializadas, como zônulas ocludentes e desmossomos, encontram-se presentes ao longo das superfícies laterais das células mesoteliais. Os desmossomos reforçam a adesão intercelular enquanto as zônulas ocludentes constituem barreiras limitantes à passagem de macromoléculas, que poderiam atravessar a camada mesotelial pela rota intercelular. A presença desta barreira é imprescindível para a manutenção de uma pressão osmótica coloidal de 25% e de um conteúdo protéico no fluido pericárdico variando de 1,3 a 3,5%, quando comparados ao sangue (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981; MAURER, WARREN e DRINKER 1940).

O transporte de substâncias do pericárdio em direção à cavidade pericárdica e vice-versa já encontra-se estabelecido. Pequenas moléculas podem ser retiradas rapidamente da cavidade pericárdica pela atuação dos capilares subpericárdicos, enquanto partículas de tamanhos maiores são transportadas com maior dificuldade (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981). O transporte entre estes compartimentos pode ser realizado através de rotas intercelulares e transcelulares. Von Recklinghausen, em 1863, descreveu a presença de estômatos, cavidades na junção de duas ou mais células mesoteliais, e postulou que estes permitem o movimento de fluido e partículas para e das cavidades serosas pela rota intercelular. Este trânsito, entretanto, seria limitado pela presença das zônulas ocludentes (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981). Em relação a rota transcelular, a presença de vesículas e vacúolos bem desenvolvidos no interior das células mesoteliais caracterizaria o trânsito de fluido e partículas de até 100 nanômetros pelo mesotélio (MUTSAERS, 2002). Também em relação a este trânsito, alguns autores, contudo, relatam que o transporte através do mesotélio

seria limitado, devido ao número de vesículas encontradas no citosol ser relativamente escasso (KLUGE e HOVIG, 1967 a e b; HOLT, 1970; ISHIHARA e cols., 1980 e 1981).

Diversas características são encontradas nas células cuja função é a síntese e secreção de proteínas. A abundância de retículo endoplasmático rugoso indica uma alta atividade de síntese. A presença de complexo de Golgi e de vesículas bem desenvolvidos pode estar relacionada com a alta taxa de processamento e transporte. Os microvilos na superfície permitem uma maior troca de substâncias através da membrana plasmática (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981). Devido às dificuldades encontradas pelos fluidos e partículas para transpor a barreira criada pelas células mesoteliais, a composição dos fluidos presentes nas cavidades que estas células delimitam, particularmente na cavidade pericárdica, pode estar relacionada aos produtos sintetizados e secretados por estas células.

1.2 FLUIDO PERICÁRDICO

Os movimentos cardíacos sempre foram influenciados pelas células endoteliais e vasos coronários através da liberação de fatores difusíveis. Entretanto, pouca atenção era dada ao pericárdio e ao fluido pericárdico em relação ao controle cardíaco (HORKAY e cols., 1998). Nos últimos anos, além de diminuir o atrito entre os folhetos durante os batimentos cardíacos, diversas evidências apontam para um papel, desempenhado pelo fluido pericárdico, relacionado com a regulação cardíaca de curto e longo-prazo, através de substâncias parácrinas e autócrinas.

A partir de análises da composição protéica (um terço a um quarto da encontrada no plasma sanguíneo) e iônica do fluido pericárdico, acreditava-se que este tinha formação a partir de um ultrafiltrado passivo do plasma sanguíneo (GIBSON e SEGAL, 1978). Substâncias como prostaglandinas (DUSTING e cols., 1983; MEBAZAA e cols., 1998), peptídeo natriurético atrial (HORKAY e cols., 1998; MEBAZAA e cols., 1998; SOÓS e cols., 2002; SZOKODI e cols., 1997), endotelina-1 (HORKAY e cols., 1998; MEBAZAA e cols., 1998; SZOKODI e cols., 1997), fatores de crescimento (MEBAZAA e cols., 1998) e uma isoforma de ECA (GOMES e cols. 2008) encontram-se presentes no fluido. A presença no fluido pericárdico de substâncias em concentrações maiores que as existentes no plasma, provavelmente indica que a origem das mesmas não ocorra por difusão do sangue, sugerindo a presença de fontes locais. Concentrações aumentadas já foram observadas particularmente em relação ao peptídeo natriurético atrial e a endotelina-1. Sabe-se que a endotelina-1 é constitutivamente secretada pelas células endoteliais, desempenhando papéis importantes no controle do tônus da musculatura lisa (MASAKI e cols., 1991), na regulação do fluxo

sanguíneo coronário e no estado contrátil do miocárdio (HORKAY e cols., 1998). Devido ao fato das células mesoteliais serem derivadas das mesmas células tronco que as células endoteliais vasculares (HORKAY e cols., 1998), Szokodi e cols. (1997) demonstraram *in vitro* que as células mesoteliais epicárdicas sintetizam e liberam substâncias vasoativas, dentre elas a endotelina-1. Assim, a endotelina presente no fluido pericárdico poderia ser produto de secreções vindas do próprio pericárdio (HORKAY e cols., 1998; MEBAZAA e cols., 1998). Estímulos fisiológicos relevantes *in vitro* produziram alterações na produção de mediadores pelas células mesoteliais pericárdicas. *In vivo*, as alterações miocárdicas poderiam contribuir para as mudanças demonstradas no conteúdo do espaço pericárdico (MEBAZAA e cols., 1998). A endotelina-1 liberada pelas células mesoteliais pode acumular-se no fluido pericárdico para posterior transporte para o espaço intersticial miocárdico, ligando-se a receptores específicos locais (MOLENAAR e cols., 1993).

Outra potencial fonte para os mediadores presentes no espaço pericárdico inclui o próprio miocárdio, cujo fluido intersticial migra pelo epicárdio para este espaço. Algumas substâncias vasoativas presentes em grandes concentrações no fluido pericárdico não são produzidas pelas células mesoteliais e não são difundidas do plasma, como o peptídeo natriurético atrial. A principal fonte de produção do peptídeo natriurético atrial se dá pelos átrios, em maior quantidade, e pelos ventrículos. Assim, a presença deste peptídeo pode ser explicada pelo influxo do fluido intersticial para a cavidade pericárdica (MEBAZAA e cols., 1998).

1.3 VIAS DE PRODUÇÃO DE ANGIOTENSINA II

O sistema renina-angiotensina é uma cascata hormonal, controlando diversas funções fisiológicas de órgãos como coração, rins e glândulas supra-renais, que contribuem para a manutenção do balanço fluido-eletrolítico corporal e da pressão arterial. O sistema clássico consiste de um mecanismo endócrino circulante em que o principal hormônio efetor é a angiotensina II (AngII) (CAREY e SIRAGY, 2003). A Ang II é um octapeptídeo apresentando a seguinte seqüência de aminoácidos Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Este peptídeo é derivado de uma proteína maior, o angiotensinogênio, produzido pelo fígado e lançado para a circulação. As células justaglomerulares dos rins produzem uma enzima, a prorenina que, através de modificações bioquímicas, é ativada em renina ativa. Na circulação, a renina age sobre o angiotensinogênio produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I). Ang I, por sua vez, sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), a qual cliva a cadeia peptídica retirando o dipeptídeo His-Leu, formando assim, a Ang II, de acordo com a

via clássica (REILLY e cols., 1982; CAREY e SIRAGY, 2003; KRAMKOWSKI e cols., 2006). A ECA é uma metaloprotease dipeptidil carboxipeptidase, sendo identificada pela primeira vez em 1956 (SKEGGS, KAHN, SHUMWAY), apresentando uma forma somática e uma testicular. A forma somática apresenta massa molecular variando de 90 kDa a 160 kDa, dependendo da sua localização (KRAMKOWSKI e cols., 2006). Grande parte da ECA está localizada na membrana plasmática de vários tipos de células, incluindo células endoteliais vasculares. Em adição a clivagem de Ang I em Ang II, a ECA metaboliza bradicinina, um ativo vasodilatador, em um peptídeo inativo. Portanto, a enzima conversora de angiotensina aumenta a produção de um potente vasoconstritor, Ang II, enquanto simultaneamente degrada um vasodilatador (ERDOS e SKIDGEL, 1997). Óxido nítrico e eicosanóides vasodilatadores são antagonistas fisiológicos de Ang II. Assim, quando um inibidor de ECA é utilizado, a síntese de Ang II é inibida, a produção de óxido nítrico e de prostaglandinas é facilitada e a degradação de bradicinina é reduzida (CAREY e SIRAGY, 2003).

Desde a primeira descrição do sistema renina-angiotensina até os dias atuais, avanços foram feitos e novas informações foram introduzidas. Tem sido caracterizada a presença de um sistema renina-angiotensina tecidual local (PAUL e cols., 2006; RE, 2004) e de um sistema intracelular (KUMAR e cols., 2007). Os sistemas tecidual e intracelular são caracterizados pela presença de componentes do sistema renina-angiotensina requeridos para produção de Ang II e de receptores específicos no próprio tecido ou célula. Em adição ao coração, outros sítios em que o sistema local tem sido demonstrado incluem os rins (HALLER e cols., 2006), o cérebro (SAKAI e SIGMUND, 2005), o pâncreas (LEUNG e CARLSSON 2005), os sistemas reprodutor e linfático (PAUL e cols., 2006) e o tecido adiposo (GOOSSENS e cols., 2007). Os sistemas renina-angiotensina sistêmico e tecidual funcionam de forma sinérgica, não existindo oposição entre eles. Acredita-se que o primeiro tenha uma maior participação na regulação do volume sistêmico e do balanço eletrolítico, enquanto que o segundo tenha efeitos teciduais locais envolvendo proliferação, crescimento, síntese protéica e funções dos órgãos nos quais encontra-se presente (PAUL e cols., 2006; LEUNG, 2007). A nova visão expandida do sistema renina-angiotensina, portanto, apresenta funções parácrinas, autócrinas e intrácrinas (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008).

A Ang II apresenta dois subtipos de receptores específicos, denominados AT-1 e AT-2. Estes receptores encontram-se localizados ao longo da vasculatura, no coração, nos rins, nas supra-renais e nos sistemas nervoso e endócrino. Contudo, existem diferenças na distribuição e expressão de cada subtipo e em diferentes fases do desenvolvimento. No tecido fetal, AT-2 é o subtipo predominante e permanece assim até ao nascimento, quando a situação

é revertida e AT-1 passa a ser predominante. No tecido adulto, entretanto, AT-2 predomina em órgãos como no útero, no ovário, na medular da supra-renal e em algumas áreas distintas do cérebro (WIDDOP e cols., 2003). AT-1 é responsável por grande parte dos efeitos fisiológicos desempenhados pela Ang II, tais como: vasoconstrição, por meio da contração da musculatura lisa dos vasos; crescimento e migração celulares; deposição de matriz extracelular; secreção de aldosterona, levando a uma maior retenção de sódio pelos túbulos renais; expressão de moléculas de adesão e de fatores pró-inflamatórios, como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6); redução da produção de óxido nítrico; além de influenciar diretamente na contração cardíaca. Os efeitos da ativação de AT-1 estão relacionados com aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca. A ativação do subtipo AT-2 desencadeia efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos, aumento de secreção de óxido nítrico, vasodilatação e efeitos anti-inflamatórios (CAREY e SIRAGY, 2003; MATAVELLI e cols., 2011; MEHTA e GRIENGLING, 2007; MIYAZAKI e TAKAI, 2006; TOUYZ e BERRY, 2002; WIDDOP e cols., 2003). Expressão aumentada de AT-2 ocorre em condições patológicas incluindo hipertensão, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, isquemia cerebral e diabetes (BAUTISTA e cols., 2001).

Inibidores de ECA são muito usados no tratamento de pacientes hipertensos ou com insuficiência cardíaca. Os efeitos benéficos deste tratamento podem estar relacionados ao bloqueio da formação de Ang II a partir de Ang I. Entretanto, durante a terapia crônica com inibidor de ECA, os níveis plasmático e tecidual de Ang II permanecem inalterados ou elevados quando comparados aos níveis de pré-tratamento (FARQUHARSON e cols., 2002; TOM e cols., 2003). Tal evidência sugere a existência de outras vias locais de conversão de angiotensina, que podem ser responsáveis por esse aumento dos níveis de Ang II em pacientes submetidos a tratamento crônico. Tem sido descrito um número crescente de enzimas capazes de gerar Ang II, dentre elas o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), a catepsina G, a tonina, a endopeptidase neutra, a calicreína e a quimase (DZAU, 1989). Urata e cols. (1990a) mostraram que aproximadamente 80% de Ang II formada no coração era dependente de quimase e 11% era dependente de ECA. Diferentemente da tonina (URATA e cols., 1990b) e catepsina G (TONNESEN e cols., 1982; URATA e cols., 1990b), a quimase cardíaca não forma Ang II a partir do angiotensinogênio (URATA e cols., 1990b).

Novos componentes do sistema renina-angiotensina continuam sendo descobertos. Enquanto que a renina e o angiotensinogênio apresentam meias-vidas plasmáticas relativamente altas, Ang I e II dentro de segundos são degradadas em diferentes peptídeos vasoativos, por peptidases coletivamente chamadas de angiotensinas (CAREY e SIRAGY,

2003). Em 2000, uma zinco metaloprotease, consistindo de 805 aminoácidos, apresentando homologia com a ECA, foi caracterizada. Esta nova enzima, ECA-2, tem a função de hidrolisar Ang I em Ang (1-9) e Ang II em Ang (1-7). Ela tem sido localizada nas membranas celulares de miócitos cardíacos, células endoteliais, túbulo renal e testículo (DONOGHUE e cols., 2000). Em contraste com a ECA, a ECA-2 não converte Ang I em Ang II, e sua atividade enzimática não é inibida por inibidores da enzima conversora de angiotensina. Ela é um inibidor efetivo de produção de Ang II pela estimulação da via alternativa de degradação de Ang I. Ang (1-7) desempenha importantes funções, pois contrabalanceando os efeitos desencadeados pela Ang II, promove vasodilatação e anti-proliferação (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008). Em adição aos novos membros do sistema renina-angiotensina, a expressão de receptores de pró-renina/renina tem sido identificada no coração, cérebro e placenta e, em baixos níveis nos rins e fígado. Acredita-se que ao serem ativados, estes receptores participem da produção local de Ang II, contribuindo para os níveis sistêmicos (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008).

1.3.1 Quimase

Ang II pode ser enzimaticamente gerada a partir de Ang I pela ação de quimase, sendo esta via observada principalmente em certas condições patológicas. Esta protease hidrolisa a extremidade C-terminal de qualquer peptídeo, após um aminoácido aromático como Phe, Tyr e Trp. Em humanos e hamsters cliva a ligação Phe-His de Ang I formando Ang II (WINTROUB e cols., 1984). Quimase cardíaca humana não degrada peptídeos como a bradicinina ou o peptídeo intestinal vasoativo, nem forma Ang II a partir de angiotensinogênio (URATA e cols., 1990b). Esta enzima é uma serino-protease solúvel, semelhante a quimiotripsina, de aproximadamente 30 kDa, estocada nos grânulos de mastócitos (CAUGHEY e cols., 1991; IRANI e cols., 1986; SCHECHTER e cols., 1986; SCHECHTER e cols., 1990). Como a quimase é sintetizada na forma de zimogênio, esta enzima é ativada por uma dipeptidil peptidase I. Camundongos que não expressam a dipeptidil peptidase I produzem quimase, porém, esta permanece inativa (WOLTERS e cols., 2001). Baseado em alinhamentos estruturais, esta enzima é dividida em duas classes distintas: α e β . A α quimase apresenta afinidade pela clivagem da ligação Phe-His da Ang I para formar Ang II. Já a β quimase, além de apresentar afinidade pela ligação Phe-His, cliva a ligação Tyr-Ile da Ang II, inativando-a (CAUGHEY e cols., 1995). Camundongos e outros roedores possuem uma α quimase e pelo menos uma β quimase (LUTZELSCHWAB e cols.,

1997). Entretanto, em bois, cães e primatas só foram identificadas quimases do tipo α (CAUGHEY, 2002).

A quimase foi inicialmente localizada nos mastócitos (SCHECHTER, 1986). Entretanto, sua presença tem sido demonstrada em outros sítios, como no endotélio (URATA e cols., 1993), nas células do músculo liso vascular (GUO e cols., 2001) e na matriz extracelular (URATA e cols., 1993). Contudo, há divergências com relação a essas informações (YAMADA e cols., 2001). Para a quimase exercer sua ação no coração, os mastócitos cardíacos devem ser estimulados a degranular e isso ocorre em estados de inflamação crônica (KOKKONEN e cols., 2003). No coração, em suas câmaras, existem diferenças quanto ao predomínio das vias de produção de Ang II, com a via da quimase prevalecendo no ventrículo esquerdo (URATA e cols., 1993). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que quimases, quando liberadas pelos mastócitos degranulados, desempenham uma variedade de funções biológicas. Estas funções incluem regulação da ativação de peptídeos vasoativos (FRANCONI e cols., 1989), degradação de matriz extracelular (VARTIO e cols., 1981), estimulação de secreção de glândulas submucosas das vias aéreas (SOMMERHOFF e cols., 1989) e aumento da permeabilidade vascular cutânea potencializando o efeito da histamina (RUBINSTEIN e cols., 1990).

Estudos de modelagem molecular da quimase humana (URATA e cols., 1993) indicam a presença de vários resíduos carregados positivamente na superfície da enzima. Estes resíduos, existentes também na quimase I de rato, permitem a ligação desta serino-protease à heparina ou a outros proteoglicanos sulfatados e glicosaminoglicanos encontrados nos grânulos dos mastócitos e também na matriz extracelular (REMGINGTON e cols., 1988). A natureza altamente básica da quimase humana é comum a outras proteinases conhecidas encontradas nos grânulos dos mastócitos incluindo triptase, carboxipeptidase A e catepsina G (URATA e cols., 1991). Quando a quimase encontra-se associada à heparina ou ao heparan sulfato, esta enzima é relativamente resistente a degradação proteolítica e à inativação pelos inibidores de serino-proteases plasmáticos (FROMMHERZ e cols., 1991). A quimase no coração pode, assim, permanecer ativa depois de se ligar à matriz extracelular. Portanto, em condições patológicas, a via da quimase pode ser o maior sítio de formação de Ang II no coração humano (URATA e cols., 1991).

Múltiplas linhas de evidências têm sugerido vias alternativas à da ECA para a produção de Ang II. No coração, a via da quimase tem papel fundamental. Segundo TAKAI e cols. (2003), a Ang II, derivada da quimase, está indubitavelmente envolvida na fibrose tecidual associada com a cardiomiopatia. A íntima relação topográfica existente entre o

coração, o líquido pericárdico e o pericárdio parietal evidencia a importância de se identificar a presença no líquido pericárdico da enzima conversora de angiotensina e da quimase, enzimas produtoras de Ang II, bem como verificar as possíveis fontes de produção destas enzimas no pericárdio parietal bovino.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo deste trabalho é o de obter evidências morfológicas e bioquímicas que permitam caracterizar, na membrana pericárdica e no fluido pericárdico bovinos, a presença de constituintes das vias de produção de Ang II.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Identificar a presença de enzima conversora de angiotensina no líquido pericárdico;
2. Identificar a presença da quimase no líquido pericárdico;
3. Identificar e quantificar os mastócitos no pericárdio parietal;
4. Identificar a presença de mastócitos quimase positivos no pericárdio parietal e outros locais desta membrana com positividade para esta enzima;
5. Identificar no pericárdio parietal os locais com positividade para enzima conversora de angiotensina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE MEMBRANAS E LÍQUIDO PERICÁRDICO

A utilização do modelo bovino neste trabalho justifica-se pelas semelhanças histológicas do pericárdio parietal bovino com o pericárdio parietal humano, conforme descrito por Ishihara e cols., (1981). Fragmentos de membrana pericárdica parietal bovina foram obtidos durante o processo de abate dos animais nos frigoríficos Delta (Delta-MG) e Boi Bravo (Uberaba-MG), mediante autorização dos veterinários responsáveis. Foram coletados 10 fragmentos, sendo um de cada boi. Em seguida, os fragmentos de membrana pericárdica foram lavados, acondicionados em solução fisiológica a 4°C e transportados para o laboratório.

O líquido pericárdico foi coletado durante o abate dos animais no Frigorífico Delta. O fluido foi aspirado da cavidade pericárdica com seringa estéril e somente as amostras límpidas e visualmente sem contaminação com sangue foram utilizadas.

Este estudo, por se tratar de condições “ex vivo”, não necessitou de parecer da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) para sua execução.

3.2 PROCESSAMENTO DO LÍQUIDO PERICÁRDICO

O líquido pericárdico foi aliquoteado e centrifugado a 12.400 rpm, a 4°C, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5402, Eppendorf®). Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e imediatamente processado ou congelado para posterior utilização.

A grande quantidade de albumina presente no fluido pericárdico foi reduzida com a utilização da resina Blue Agarose (Bio Rad®). Amostras de 250 µl do extrato bruto de líquido pericárdico foram incubadas com 1 ml de Blue Agarose, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6. A incubação foi realizada por 2 horas, à temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.200 rpm, a 4°C e os sobrenadantes foram coletados para serem utilizados posteriormente.

3.3 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Amostras de 500 µl de líquido pericárdico, obtidas após a retirada de albumina ou o extrato bruto, foram adicionadas de 2,5 µl de anticorpo monoclonal anti-ECA (200 µg/ml, Santa Cruz®) ou anti-quimase (200 µg/ml, Santa Cruz®). Às amostras, incubadas sob agitação, a 4°C, durante a noite, foram adicionados 25 µl de esferas de Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences®) conjugadas com proteína G. As suspensões foram mantidas sob

agitação, por 2 horas, a 4°C e centrifugadas por 5 minutos, a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados coletados. Em alguns experimentos, o precipitado foi solubilizado e lavado diversas vezes com solução de lise (NaCl 100 mM, SDS 1% e Tris 50 mM, pH 8,0). Em seguida, incubado com tampão Tris 50mM, contendo SDS 1% e DTT 50 mM, a 95°C, por três minutos, centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante coletado foi adicionado de azul de bromofenol aquoso 0,1%. Em outros experimentos, os imunoprecipitados foram solubilizados com 20 µl de solução de amostra (Laemmli, 1970). Os imunocomplexos obtidos foram imediatamente analisadas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) ou estocadas a -80 °C para serem posteriormente analisados.

3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras foram analisadas em géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). Géis de 7,5% de concentração de acrilamida/bis-acrilamida, para ECA, e de 12,5%, para quimase, e espessura de 1,5mm foram utilizados. Os imunoprecipitados obtidos, solubilizados em solução de amostra em condições redutoras, foram aquecidos a 70°C, em banho seco (DB 100, LGC Biotecnologia), por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em géis descontínuos e submetidas à eletroforese (Mighty Small II SE 260, Amersham Biosciences®), a uma corrente constante de 25 mA. Após a corrida, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences®) e as duplicatas dos géis colocadas em solução fixadora contendo metanol, ácido acético e água, na proporção de 5:2:2, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Os géis fixados foram corados com azul de Coomassie [metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v); azul de Coomassie 0,25% (w/v); (Sigma®)], descorados com ácido acético 10%, documentados e secos à vácuo, em papel 3 MM, por 2 horas, a temperatura de 60°C, utilizando uma secadora de gel (Gel Dryer 2000, Amersham Biosciences®).

3.5 TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE

As duplicatas dos géis não fixadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose, em uma cuba de transferência (TE 22 Amersham®) contendo tampão Towbin modificado (Towbin e Gordon, 1984), sob agitação, durante seis horas, a 4°C e com corrente constante de 200 mA. Após as transferências, as membranas foram coradas com Ponceau S para verificar a presença de polipeptídeos na membrana e descoradas com água destilada, secas em papel de filtro e acondicionadas em papel alumínio para posterior utilização.

3.6 IMUNOQUÍMICA EM MEMBRANAS DE NITROCELULOSE

Após transferência, as membranas foram colocadas para incubar “overnight”, sob agitação, a 4°C em solução constituída por albumina bovina sérica 2%, leite desnatado 10%, Tween 20 0,1% em tampão Tris-NaCl 0,05 M, pH 7,2, para bloquear ligações inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas sob agitação, à temperatura ambiente, por duas horas, com anticorpo primário anti-ECA (200 µg/ml, Santa Cruz®) diluído 1:100 em tampão Tris-NaCl 0,05 M pH7,2 contendo albumina bovina sérica 1% e Tween 20 0,05%. Após incubação, as membranas foram lavadas 10 vezes, 2,5 minutos cada, com tampão Tris-NaCl 0,05 M, pH 7,2 contendo Tween 20 0,05%. Em seguida, as membranas foram incubadas por três horas, à temperatura ambiente, sob agitação, com anticorpo secundário F(ab')₂ anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Amersham®), diluído 1:1000 em tampão Tris-NaCl 0,05 M pH7,2 contendo albumina bovina sérica 1% e Tween 20 0,05%. Após a lavagem, realizada da mesma forma que a anterior, as membranas foram submetidas ao processo de revelação com uma solução de DAB (diaminobenzidina, DAKO®) como substrato. A revelação foi inativada em água destilada e as membranas foram secas em papel de filtro e acondicionadas em papel alumínio.

3.7 PROCESSAMENTO DA MEMBRANA PERICÁRDICA PARIETAL

Os fragmentos de membrana pericárdica foram lavados em salina e dissecados em um fluxo laminar horizontal (Labconco), na presença de meio nutriente (DMEM), para retirada do tecido adiposo existente na camada epipericárdica do pericárdio parietal. Cada fragmento de membrana apresentava aproximadamente uma área de 100cm² (10cm x10cm). Destes fragmentos, foram obtidos 2 (dois) fragmentos de 1 (um) cm² cada (fragmentos A e B), de regiões diferentes das 10 membranas. Os fragmentos A e B foram fixados em formalina tamponada a 10%, por 24 horas, a temperatura ambiente. Em seguida foram desidratados em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Secções de 5 µm foram obtidas, sendo colocadas em lâminas, com adesivo ou não, e utilizadas nas técnicas de histoquímica e imunohistoquímica.

Outros fragmentos, obtidos posteriormente, foram dissecados conforme descrito anteriormente, lavados em tampão fosfato (PBS) e submetidos ao processo de fixação por congelamento. Foram utilizados diversos protocolos para testar e comparar os efeitos dos diferentes meios de congelação na estrutura morfológica das membranas pericárdicas: (a) fragmentos de aproximadamente 1,0 x 0,3 cm foram colocados em meio crioprotetor (OCT) e congelados em nitrogênio líquido por 2 minutos; (b) fragmentos de membrana pericárdica

(1,0 x 0,3 cm) foram colocados em criotubos e congelados em nitrogênio líquido por 3 minutos. Os fragmentos foram rapidamente retirados dos tubos, embebidos em OCT e congelados no criostato (Leica). Secções de 2 µm obtidas foram colocadas em lâminas, fixadas em acetona, por 10 minutos, a temperatura ambiente, e imediatamente utilizadas ou então acondicionadas a -20°C.

3.8 HISTOQUÍMICA PARA MASTÓCITOS

A técnica histoquímica utilizada para evidenciar os mastócitos foi a coloração do azul de toluidina não alcoólico. Para isso, as secções foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes até chegar em água. Todo o procedimento desta técnica foi realizado a temperatura ambiente. As secções foram incubadas em permanganato de sódio a 0,5% por 2 minutos e lavadas três vezes com água destilada. Incubadas em bissulfito de sódio 1%, lavadas em água corrente por 3 minutos e em água destilada três vezes. Finalmente, as secções foram incubadas em solução de azul de toluidina não alcoólico 0,02% por cinco minutos e lavadas em água destilada três vezes. Após coradas, as secções foram desidratadas, diafanizadas e montadas. Para cada reação histoquímica foram utilizadas secções de pele humana, como controle positivo, obtida de necropsia realizada pela disciplina de patologia geral (UFTM).

3.9 ANÁLISES MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

As análises morfológica e morfométrica foram realizadas em secções de membrana pericárdica coradas pela técnica do azul de toluidina 0,02%. Foram observadas 40 lâminas, com três cortes cada, sendo duas lâminas de cada um dos fragmentos (fragmentos A e B), dos 10 animais utilizados. Todas as secções foram examinadas em um microscópio de luz comum. Os mastócitos foram contados em um aumento de 400x e classificados de acordo com sua integridade em granulados e degranulados. Os resultados desta análise foram expressos como o número de mastócitos por mm² (densidade). Para obtenção da área de cada secção, os fragmentos foram fotografados em câmera digital (SONY) e as áreas das secções foram medidas, utilizando uma mesa digitalizadora (i608 Genius®), com um programa de análise de imagens (ImageJ, NIH).

3.10 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para observarmos a presença de quimase e ECA, as secções obtidas no item 3.7 foram submetidas à técnica de imunohistoquímica. As secções foram desparafinizadas e

hidratadas em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes. As secções foram submetidas ao processo de recuperação antigênica em panela de pressão (Pascal, Dako), em tampão citrato pH 6,0 ou em TBS pH 9,0. Após o processo de reativação, foram incubadas com: a) água oxigenada em tampão TBS (Tris 0,05M e NaCl 0,9% pH 7,4) por 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena; b) glicina 0,2M em tampão TBS por 40 minutos, para bloqueio dos radicais aldeídicos; c) BSA 2% em TBS + Triton X 0,1% por uma hora, para bloqueio das ligações inespecíficas. Entre o bloqueio da peroxidase e glicina as lâminas foram lavadas 4 vezes com TBS para bloquear a ação da água oxigenada. Após os bloqueios, as secções foram incubadas ou com anticorpo anti-quimase (200 µg/ml, Santa Cruz®) ou com anti-ECA (200 µg/ml, Santa Cruz®), em concentrações diferentes, em TBS mais BSA 1% e Triton X100 0,1%, por 3 horas, à temperatura ambiente. A seguir foram então lavadas oito vezes com TBS e Triton X100 0,05% para retirar o excesso de anticorpo não ligado, colocadas para incubar com o anticorpo secundário biotilado (Diagnostic BioSystems) por 30 minutos, lavadas diversas vezes e incubadas com uma solução de streptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos (Diagnostic BioSystems). Após, as secções foram lavadas diversas vezes e colocadas em solução reveladora [TBS, DAB (diaminobenzidina, DAKO®) e água oxigenada (30 µl)], sob agitação por 15 minutos. Uma vez reveladas, as secções foram colocadas em água corrente por um minuto, desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, montadas, observadas e documentadas em fotomicroscópio (Axiophot Zeiss).

3.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As secções de pericárdio parietal obtidas após criomicrotomia foram lavadas em TBS, incubadas ou com anticorpo anti-quimase (200 µg/ml, Santa Cruz®) ou com anti-ECA (200 µg/ml, Santa Cruz®), em concentrações diferentes, por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, as secções foram lavadas com TBS mais Triton X100 0,05%, diversas vezes, e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugada com fluoresceína (AlexaFluor, Molecular Probes 488) ou com anti-IgG de coelho conjugada com rodamina (AlexaFluor Molecular Probes 568). Após serem exaustivamente lavadas, as secções foram montadas com Fluoromount G® (SouthernBiotech) e observadas e documentadas em microscópio de fluorescência Olympus, em comprimentos de onda adequados. Algumas secções foram contracoradas com corante nuclear DAPI – *4'6-diamino-2-phenylindole* (Molecular Probes), por 5 minutos, à temperatura ambiente. Controles negativos foram obtidos através da omissão da incubação com o anticorpo primário.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o software SigmaStat. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Quando a distribuição e a homogeneidade de variância não foram normais os dados foram expressos em mediana com os valores máximo e mínimo, e o teste de Mann-Whitney realizado. Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE ECA NO LÍQUIDO PERICÁRDICO

As figuras 1A e 1B exibem o perfil eletroforético, corado com azul de Coomassie, obtido pela imunoprecipitação do extrato bruto de fluido pericárdico (FP) com anticorpo anti-ECA e a membrana de nitrocelulose, contendo as frações polipeptídicas transferidas de um gel, submetida à imunoquímica com anticorpo anti-ECA, respectivamente. Na figura 1A, podemos notar a presença de diversas bandas polipeptídicas, algumas bastante espessas e intensamente coradas e outras mais discretas. Observamos bandas com massas moleculares semelhantes às massas da enzima conversora de angiotensina. A espessa banda de aproximadamente 56000 Da é provavelmente a cadeia pesada da imunoglobulina (cabeça de seta, figura 1A). Na figura 1B observou-se a presença de uma única banda positiva (seta), com massa molecular aproximada de 146.000 Da, existente também no perfil eletroforético da figura 1A (seta), identificada, portanto, como uma isoforma de ECA presente no líquido pericárdico bovino.

4.2 DETECÇÃO DE QUIMASE NO LÍQUIDO PERICÁRDICO

A figura 2 mostra o perfil eletroforético obtido pela imunoprecipitação do extrato bruto do líquido pericárdico com anticorpo anti-quimase. Observou-se a presença de uma banda de aproximadamente 30.000Da (seta), que poderia corresponder a enzima quimase. Porém, quando foi realizada a técnica de imunoquímica nas duplicatas dos géis transferidos para as membranas de nitrocelulose, não foi evidenciada nenhuma marcação nas frações polipeptídicas transferidas (não mostrado), mesmo quando o anticorpo primário encontrava-se em diluições bem pequenas.

4.3 IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DOS MASTÓCITOS

Com o objetivo de se verificar a presença de mastócitos, secções de pericárdio parietal foram coradas com azul de toluidina (Figura 3A, B, C e D). A forma destas células variou de alongada a oval. O núcleo, quando passível de observação, era oval ou encontrava-se obscurecido pelos grânulos metacromáticos. Em relação à integridade, os mastócitos granulados apresentavam limites celulares mais definidos e uma metacromasia mais intensa (Figura 3A e B, setas). Já os mastócitos degranulados apresentavam limites celulares pouco definidos e uma coloração metacromática mais discreta (Figura 3C e D, setas). Em relação à

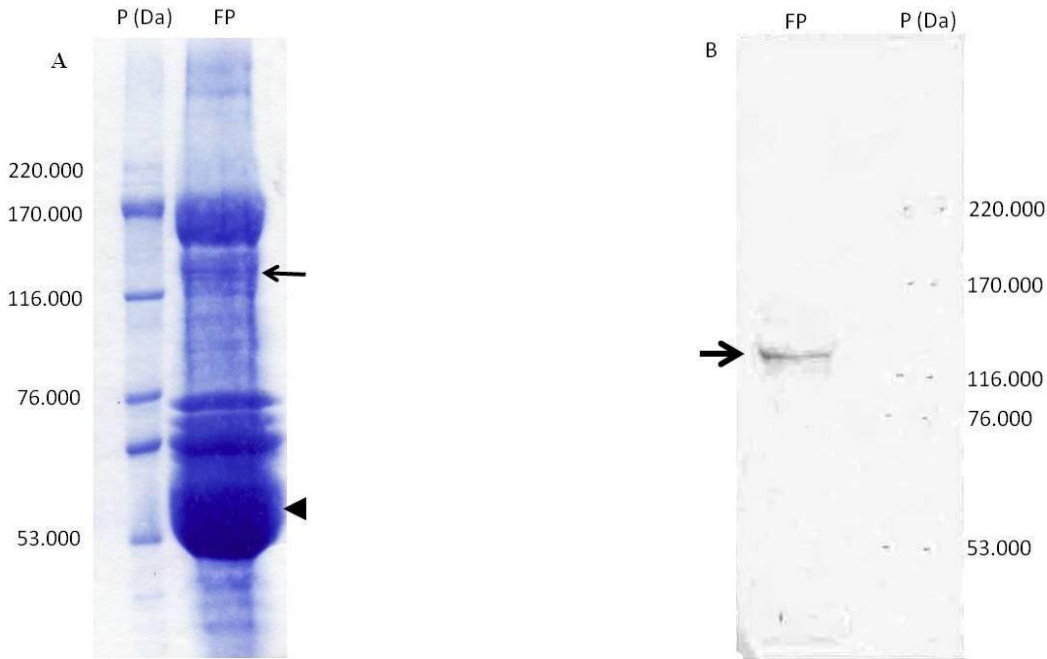


Figura 1: Gel representativo corado por azul de Coomassie (A) e *western blot* para ECA (B) do extrato bruto do líquido pericárdico imunoprecipitado com anticorpo anti-ECA (FP) submetido à eletroforese (SDS-PAGE, concentração do gel de 7,5%). A seta em “A” indica a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 146 kDa, também observada na membrana submetida à imunocoloração para detecção de ECA (B). Cabeça de seta em “A” indica a cadeia de auto peso da IgG. P(Da), padrões de pesos moleculares.

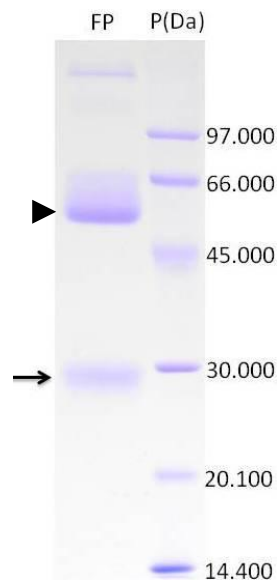


Figura 2: Gel representativo (concentração 12,5%) do extrato bruto do líquido pericárdico, imunoprecipitado com anticorpo anti-quimase (FP), submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, corado com azul de Coomassie. A seta indica a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Cabeça de seta indica a cadeia de auto peso da IgG. P(Da), padrões de pesos moleculares.

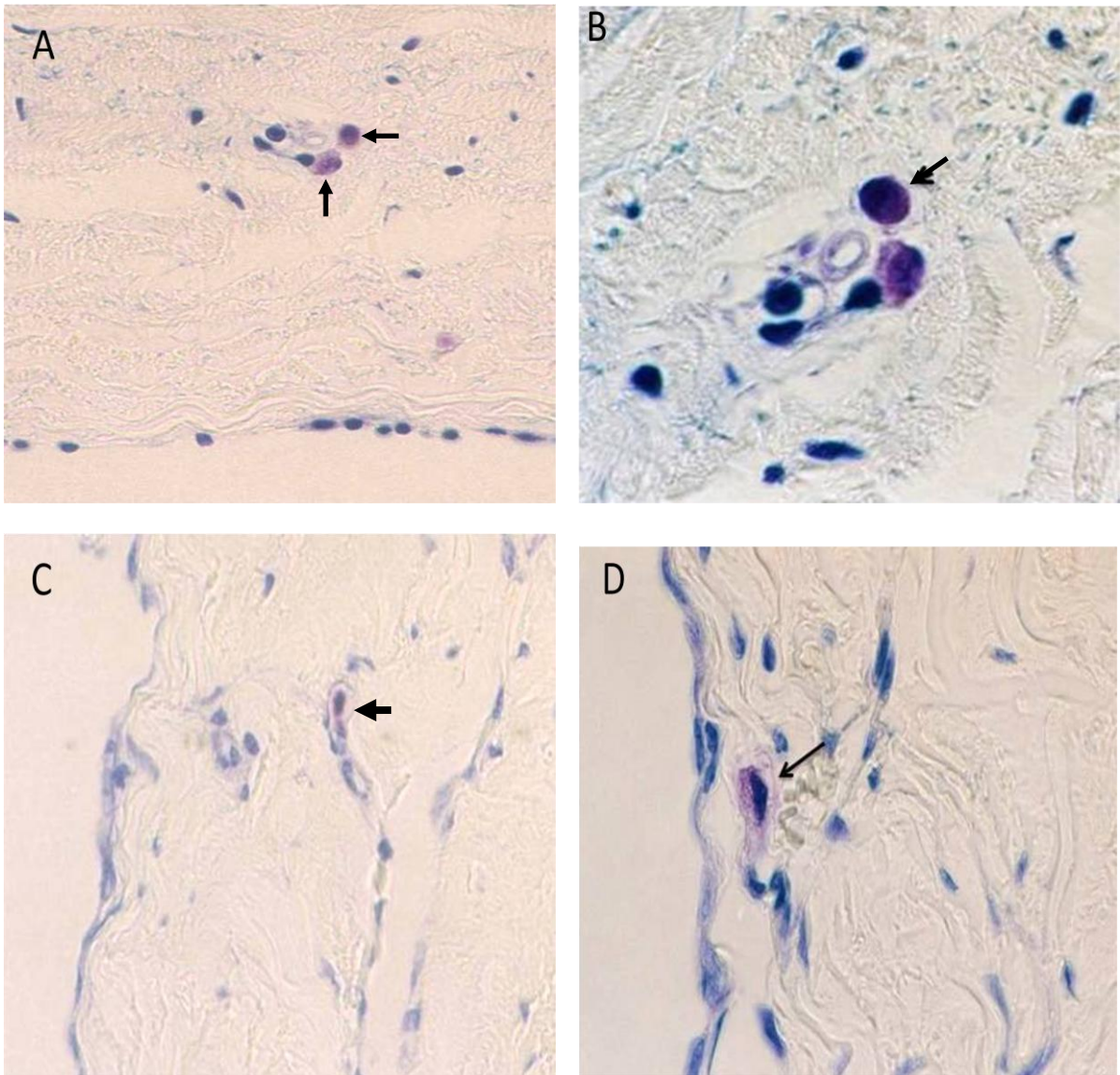


Figura 3: Secções histológicas representativas de membrana pericárdica parietal bovina, fixada em formalina 10%, incluídas em parafina e corados com azul de toluidina não alcoólico. As setas em “A” e “B” mostram mastócitos granulados. Em “C” e em “D” mostram mastócitos degranulados. Em “D” podemos observar a localização submesotelial deste mastócito. Aumentos originais: A e C 40x e B e D 100x.

localização dos mastócitos no pericárdio parietal, algumas células encontram-se localizadas imediatamente abaixo da camada mesotelial (Figura 3D, seta). Entretanto, a maioria destas células apresentavam localização na camada fibrosa, próximas ou não dos vasos sanguíneos aí existentes (Figura 3B, seta).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS MASTÓCITOS

A figura 4 refere-se à quantidade total de mastócitos por mm^2 (densidade) de cada animal analisado. A densidade de mastócitos apresentou variação, com uma média de $43,77 \pm 14,73$ mastócitos/ mm^2 . A maior densidade apresentada foi de $74,52$ mastócitos/ mm^2 e a menor de $24,63$ mastócitos/ mm^2 . Em relação à integridade destas células, observou-se uma densidade de mastócitos degranulados maior do que a de mastócitos granulados em todos os animais (Figura 5). A mediana da densidade de mastócitos granulados foi de $3,79$ ($2,77$ - $4,81$) enquanto a de degranulados foi de $36,68$ ($32,06$ - $46,27$) mastócitos/ mm^2 , sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

4.5 IMUNOLocalização DE QUIMASE NA MEMBRANA PERICÁRDICA

Foram utilizadas técnicas imunohistoquímicas, com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, para detecção de quimase assim como a técnica da imunofluorescência. Os resultados obtidos através das reações imunohistoquímicas, não permitiram uma adequada visualização de marcações positivas nas secções de membranas pericárdicas fixadas com formalina 10% e incluídas em parafina. Entretanto, quando a técnica da imunofluorescência foi utilizada, em secções de membrana pericárdica fixadas por congelamento ultra-rápido, observamos a presença de mastócitos quimase-positivos (Figura 6A e 6B), embora em número bastante reduzido. Estes mastócitos apresentavam localização semelhante à observada nas secções coradas pelo azul de toluidina, estando alguns logo abaixo da camada mesotelial (Figura 6A) e outros no estroma fibroso da membrana pericárdica (Figura 6B). Nenhuma reatividade foi observada em outras células da camada fibrosa nem na camada mesotelial (Figura 6A e 6B). Os controles, utilizados para se verificar a especificidade da reação, mostraram-se completamente negativos (não mostrado).

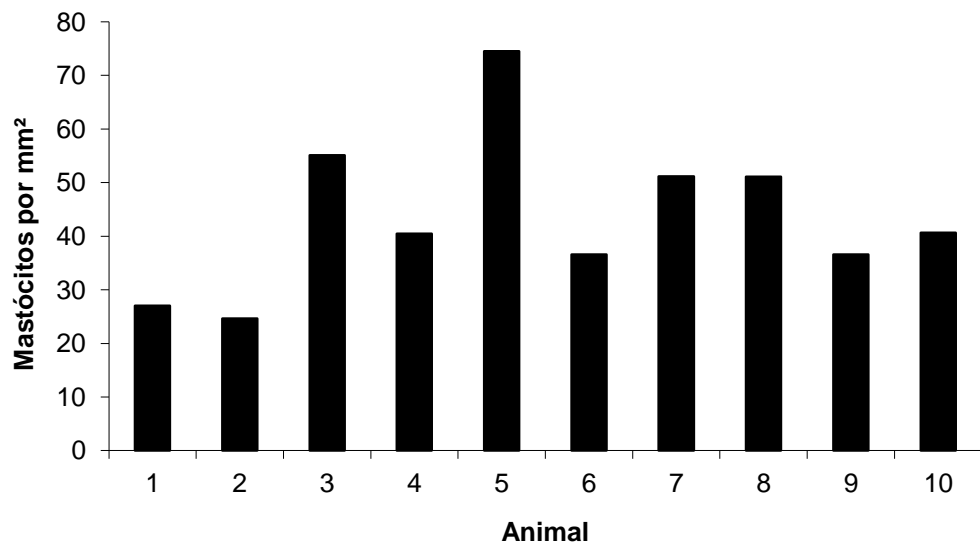


Figura 4: Número de mastócitos por mm² no pericárdio parietal bovino. Fragmentos foram fixados em formalina 10%, incluídos em parafina e as secções coradas pelo azul de toluidina. A densidade média foi de $43,77 \pm 14,73$ mastócitos/mm² por animal.

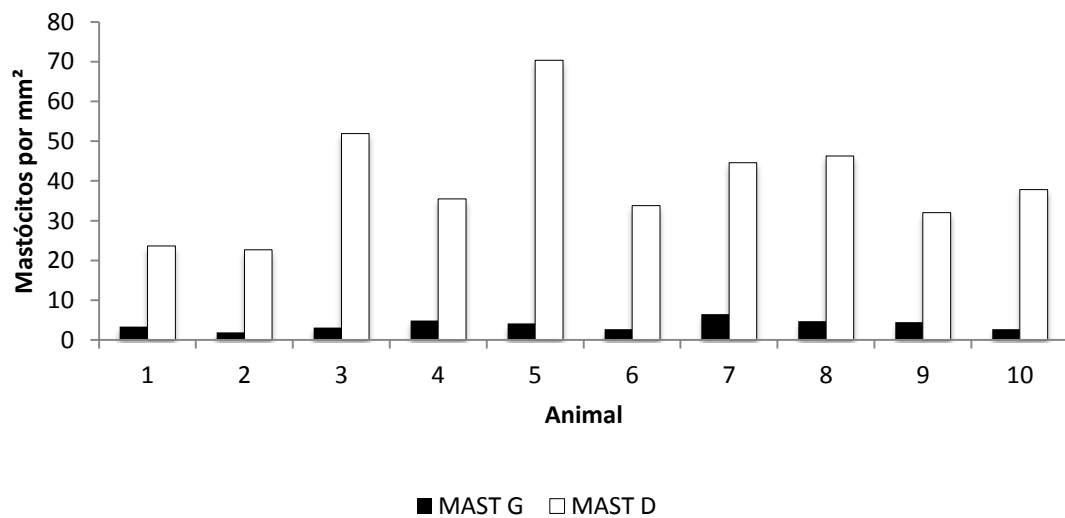


Figura 5: Número de mastócitos por mm², granulados e degranulados, existentes no pericárdio parietal bovino. Fragmentos foram fixados em formalina 10%, incluídos em parafina e as secções coradas pelo azul de toluidina. A mediana da densidade para os granulados foi de 3,79 (2,77-4,81) e para os degranulados foi de 36,68 (32,06-46,27), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

4.6 IMUNOLOCALIZAÇÃO DE ECA NA MEMBRANA PERICÁRDICA

As secções de pericárdio parietal bovino, fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina, foram submetidas à reação imunohistoquímica para detecção da ECA. As pré-incubações utilizadas para bloqueio dos radicais aldeídicos, da peroxidase endógena e de ligações inespecíficas mostraram-se eficientes. Entretanto, os resultados obtidos apresentaram uma marcação extremamente discreta para a ECA na camada mesotelial da membrana pericárdica bem como na parede dos vasos sanguíneos existentes nesta membrana. A utilização de técnicas de recuperação antigênica com o emprego de diferentes soluções permitiu evidenciar a reação imunohistoquímica de forma mais intensa (não mostrado). À imunofluorescência, as secções de membrana pericárdica, submetidas ao congelamento ultrarrápido, mostraram de maneira inequívoca a marcação positiva para ECA na camada mesotelial, embora esta marcação não fosse contínua por todo mesotélio nem com a mesma intensidade (Figura 6C). A parede dos vasos sanguíneos existentes na membrana pericárdica também se mostrou positiva para a presença da ECA (Figura 6D). Os controles negativos não evidenciaram nenhuma marcação (não mostrado).

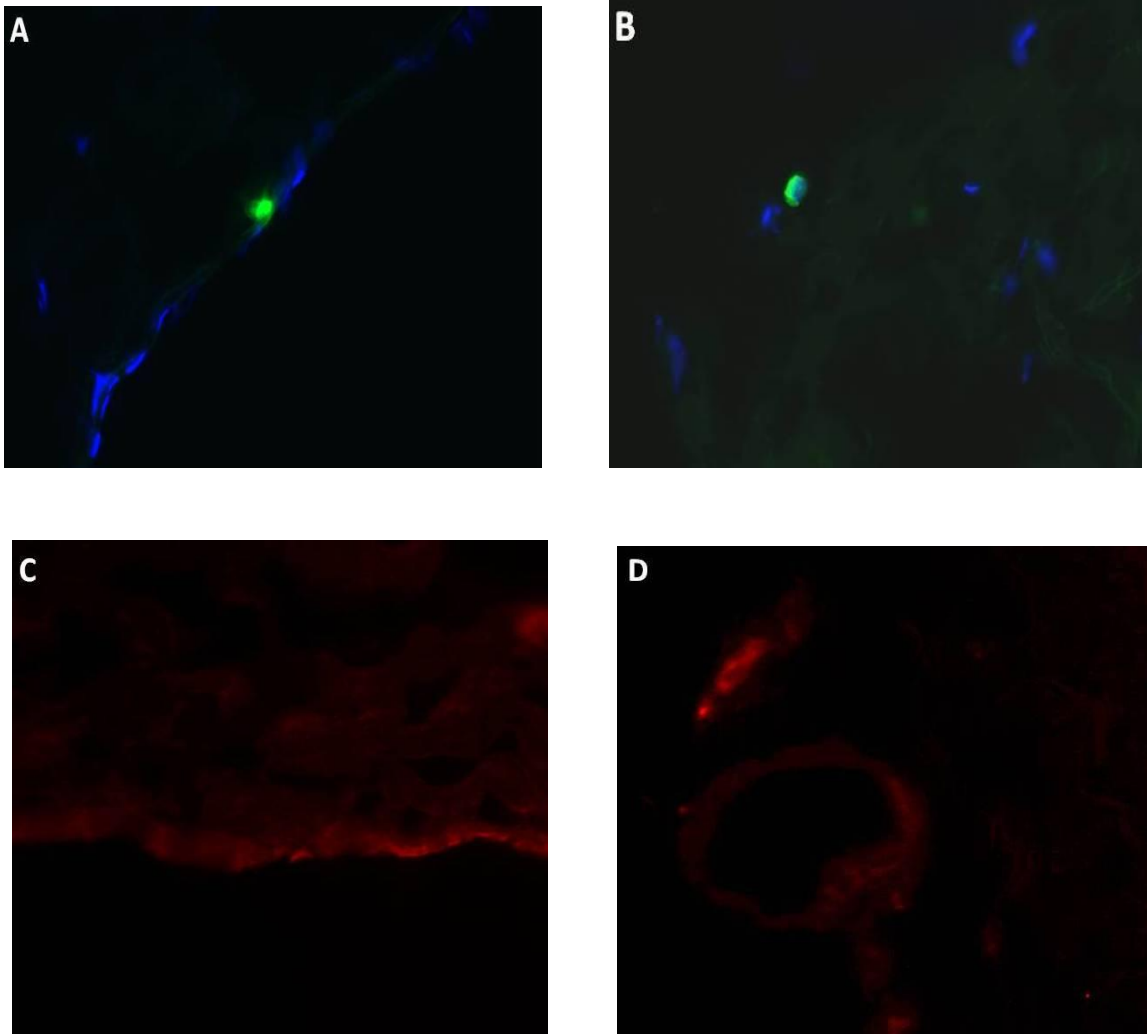


Figura 6: Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência, de preparações de membrana pericárdica, fixada por congelamento ultra rápido. “A” e “B” marcação com anticorpo anti quimase. Observar a presença de mastócitos quimase positivos (em verde). Secções contracoradas com o corante nuclear (azul) DAPI. Em “C” e “D” marcação com anticorpo anti ECA. Em “C” notar a positividade para a camada mesotelial (em vermelho). Em “D” observar a marcação positiva para ECA em um vaso sanguíneo existente na camada fibrosa da membrana pericárdica. Aumentos originais: 40x.

5 DISCUSSÃO

A importância do pericárdio e do fluido pericárdico no controle da função cardíaca tem emergido nos últimos anos. A natureza quiescente do pericárdio visceral e do parietal tem sido questionada, sendo sugerido um importante papel na produção de substâncias que poderiam exercer ações parácrinas sobre o coração. Quando comparamos o pericárdio parietal humano com o de outras espécies, verificamos que o pericárdio parietal bovino é o que apresenta constituição histológica mais próxima à da espécie humana (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981). O desenvolvimento de modelos experimentais adequados é essencial para que os resultados obtidos a partir destes modelos possam, a partir também das observações resultantes de estudos em humanos, ser traduzidos em implicações terapêuticas. A caracterização do pericárdio bovino, principalmente dos produtos de secreção das células e tecidos que delimitam a cavidade pericárdica, é fundamental para se entender melhor a biologia e a importância desta membrana, bem como do fluido pericárdico, em condições fisiológicas ou associadas a alguma doença.

Assim, o presente estudo foi realizado com os objetivos de se detectar a presença de constituintes da via clássica e das vias alternativas para a produção de Ang II no fluido pericárdico de bovinos e verificar o papel da membrana pericárdica como eventual fonte de constituintes destas vias de produção de Ang II. Poucos são os trabalhos realizados em condições fisiológicas que se propõem a clarificar a composição do fluido pericárdico, mesmo em humanos. Além de prostaglandinas, substância P, renina, peptídeo natriurético atrial, endotelina-1 (MEBAZAA e cols., 1998) entre outras substâncias, foi observada também a presença do peptídeo vasoativo Ang II neste fluido (CORDA e cols., 1997). A visão clássica da Ang II como um agente vasoativo, pertencente ao sistema renina-angiotensina, que participa da regulação hemodinâmica sistêmica e local, tem sido ampliada para considerar este peptídeo como uma verdadeira citocina, apresentando efeitos pró-fibróticos e pró-inflamatórios evidentes, com um papel ativo na patologia cardiovascular. Além da produção através da via clássica, novas enzimas foram descritas e o conhecimento sobre as vias alternativas de produção de Ang II se expandiu.

Para detecção da enzima conversora de angiotensina (ECA), pertencente à via clássica, amostras de fluido pericárdico foram imunoprecipitadas e submetidas à eletroforese seguida de imunodeteção em membranas de nitrocelulose. Os resultados de diferentes experimentos demonstraram a presença de uma tênue banda, com massa molecular de aproximadamente 146.000 Da, indicando a presença de uma isoforma de ECA no fluido

pericárdico bovino (Figura 1B). Em amostras de fluido pericárdico humano, Gomes e cols. (2008) purificaram uma enzima com atividade de conversora, sugerindo ser uma isoforma de ECA. Assim, a ECA existente no fluido pericárdico bovino poderia ser a responsável pela produção de parte da Ang II existente neste fluido.

A presença da ECA no fluido pericárdico levanta a hipótese de produção local desta enzima, como já demonstrado para substâncias deste fluido (HORKAY e cols., 1998; MEBAZAA e cols., 1998; SZOKODI e cols., 1997). Como a enzima conversora de angiotensina é uma proteína integral de membrana com isoforma somática apresentando massa molecular acima de 90.000 Da (KRAMKOWSKI e cols., 2006), e como a estrutura histológica da camada mesotelial do pericárdio parietal não permite o trânsito paracelular de macromoléculas devido à presença de junções de oclusão (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981), a identificação da ECA nos tecidos adjacentes à cavidade pericárdica poderia sugerir uma síntese local desta proteína. Assim, a localização celular, que pode ser uma indicação do potencial de síntese da proteína pela célula, foi então realizada. A imunolocalização desta enzima foi feita em secções de membrana pericárdica incluídas em parafina e em secções obtidas através de congelamento ultra-rápido. Os resultados da imunofluorescência evidenciaram marcação positiva: a) na parede dos vasos existentes na membrana pericárdica, fato já esperado, pois a ECA apresenta distribuição ubíqua no endotélio; b) na camada mesotelial, demonstrando a presença de ECA no mesotélio (Figura 6C). A presença do RNAm para a ECA no mesotélio peritoneal humano já foi evidenciada (KYUDEN e cols., 2005) através de RT-PCR. Assim, a camada mesotelial poderia ser uma das possíveis fontes da enzima conversora de angiotensina existente no líquido pericárdico. Estes dados com toda certeza são amparados pelas características morfológicas destas células, que apresentam retículo endoplasmático abundante e complexo de Golgi desenvolvido (ISHIHARA e cols., 1980 e 1981), facilitando a aceitação de seu papel na produção de compostos do fluido pericárdico.

A existência de vias de conversão de Ang I para Ang II independentes de ECA já a algum tempo tem sido sugeridas. Dentre elas o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), a catepsina G, a tonina, a endopeptidase neutra, a calicreína e a quimase (DZAU, 1989). Particularmente em relação ao sistema cardiovascular, Urata e cols. (1990a) mostraram, em condições patológicas, que aproximadamente 80% de Ang II formada no coração era dependente de quimase e aproximadamente 11% era dependente de ECA. Com base nestes achados, a contribuição da quimase para a produção de Ang II existente no fluido pericárdico não poderia ser descartada. Com o intuito de se verificar a presença da quimase, amostras de

líquido pericárdico foram imunoprecipitadas, submetidas à eletroforese e à imunodeteção para identificação desta serino-protease. Os resultados não evidenciaram nenhuma marcação positiva nas membranas de nitrocelulose submetidas à reação imune para detecção de quimase (Figura 2). Embora não tenha sido detectada a presença desta protease nas amostras de fluido pericárdico, este fato não exclui a possibilidade de sua presença no fluido. Algumas explicações podem ser levantadas para a não evidência desta protease: i) a quantidade de quimase existente no fluido pericárdico é tão reduzida que o método utilizado para detecção não foi sensível o suficiente; ii) o anticorpo anti-quimase humana, utilizado para detecção de quimase bovina, não ter reconhecido o antígeno, a despeito da baixa diluição utilizada e o uso de técnicas de recuperação antigênica (panela de pressão e panela a vapor), com diferentes soluções (tampão citrato pH 6,0 e TRIS pH 9,0); iii) uma outra explicação estaria relacionada a presença, a quantidade e aos subtipos de mastócitos existentes na membrana pericárdica.

Assim, verificamos a presença e em seguida procedemos à quantificação de mastócitos na membrana pericárdica bovina. Embora já esteja bem estabelecido que a acidez do fluido de Carnoy facilite as ligações iônicas entre os mucopolissacarídeos ácidos dos grânulos de mastócitos com os corantes catiônicos básicos (UVNAS e cols., 1970), e diversos trabalhos demonstrarem uma maior quantidade de células coradas quando o fixador é a solução de Carnoy, utilizamos formalina 10% tamponada. A escolha do fixador recaiu sobre a necessidade de se realizar imunohistoquímicas para detecção de quimase e pelo fato da solução de Carnoy reduzir o número de células quimase-positivas nas colorações imunohistoquímicas (KANBE e cols., 1998). A fixação com a formalina 10% seguida pela coloração das secções com a técnica do azul de toluidina identificou os mastócitos na membrana pericárdica (Figura 3). A densidade de mastócitos entre os animais analisados variou, apresentando uma média de $43,77 \pm 14,73$ células por mm^2 . Dados de densidade de mastócitos no pericárdio parietal são escassos. Wegelius (1956) realizou um estudo quantitativo de mastócitos em bois e cavalos. Em relação ao pericárdio bovino, ele obteve uma densidade média de $43,2 \pm 5,7$ células, sendo semelhante à densidade obtida em nossos resultados. Em nosso estudo, observamos também a integridade dos mastócitos. Os mastócitos quantificados foram subdivididos em granulados e degranulados. A densidade de mastócitos granulados e degranulados, expressa pela mediana, foi de 3,79 (2,77-4,81) e 36,68 (32,06-46,27), respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

A presença de mastócitos e principalmente de mastócitos degranulados na membrana pericárdica indica que estas células liberaram o conteúdo de seus grânulos para o interstício. A quimase, sendo uma enzima com massa molecular de 30 KDa, poderia então

difundir-se para o fluido pericárdico, fato não observado através da reação imune sobre as membranas de nitrocelulose (não mostrado).

Após a detecção de mastócitos no pericárdio parietal, procedemos a identificação dos subtipos de mastócitos existentes. Mastócitos constituem uma população heterogênea com respeito a suas características funcionais, bioquímicas e histoquímicas (BIENENSTOCK e cols., 1985). No homem, assim como em gatos, cães e bois, estudos imunohistoquímicas e enzimáticos são utilizados para verificar a presença ou ausência de quimase e triptase. Estas serino-proteases identificam os subgrupos de mastócitos existentes nestes mamíferos (IRANI e cols., 1986). Como o nosso objetivo era o de identificar a via da quimase para a produção de Ang II, verificamos somente a presença de mastócitos quimase-positivos.

A imunohistoquímica, em fragmentos fixados em formalina 10% e incluídos em parafina, para detecção de quimase não permitiu, com clareza, a observação de nenhuma coloração positiva detectável. Resultados semelhantes foram obtidos para a imunodeteção de quimase, em bovinos, em diferentes órgãos, embora mastócitos quimase-positivos tenham sido identificados utilizando-se técnicas histoquímicas com substratos específicos para quimase (JOLLY e cols., 2000; KUTHER e cols., 1998; WELLE e cols., 1995). Assim, como a fixação é uma etapa crítica para detecção de quimase, utilizamos as técnicas de congelamento ultra-rápido na tentativa de evidenciar esta protease. As técnicas de congelamento, se não realizadas adequadamente, introduzem artefatos importantes no material biológico. Vários protocolos foram testados e após obtenção de um material biológico com preservação histológica adequada utilizamos a técnica da imunofluorescência, por ser um método mais sensível. As secções obtidas dos fragmentos de membrana pericárdica congelados e submetidos à criomicrotomia foram sondadas para a presença de mastócitos quimase-positivos. Marcação positiva foi evidenciada nestas células (Figura 6A e 6B). Embora não tenha sido realizada uma avaliação quantitativa dos resultados da imunofluorescência, a quantidade de mastócitos marcada foi muito pequena quando comparada a média obtida pela coloração do azul de toluidina. O pequeno número de mastócitos quimase-positivos poderia justificar a não detecção desta serino-protease no fluido pericárdico. Outro ponto a ser abordado é que, embora apresentando massa molecular de 30KDa, podendo então se difundir para a cavidade pericárdica, aparentemente a quimase secretada liga-se as moléculas de heparan sulfato existentes na matriz dos tecidos conjuntivos (REMINGTON e cols., 1988), impedindo assim sua difusão para os tecidos adjacentes ou mesmo para outros compartimentos. Além disso, a não marcação do mesotélio, pelas técnicas

de imunohistoquímica e de imunofluorescência realizadas para detecção de quimase, sugere que esta camada não seria um possível sítio de síntese desta enzima.

Assim, maiores esclarecimentos a respeito da presença de vias alternativas para a produção de Ang II no fluido pericárdico se fazem necessários, pois as substâncias presentes neste fluido podem atuar diretamente sobre o coração, garantindo a manutenção das atividades celulares normais bem como contribuindo para a homeostase do meio extracelular cardíaco.

6 CONCLUSÕES

1. Foi identificada uma isoforma de ECA com massa molecular de aproximadamente de 146 kDa no fluido pericárdico bovino;
2. Não foi detectada a presença de quimase no líquido pericárdico bovino;
3. Mastócitos foram identificados na membrana pericárdica parietal de boi e em quantidades semelhantes a dados descritos na literatura. De acordo com a integridade, a quantidade de mastócitos degranulados mostrou-se superior quando comparado aos granulados, sendo esta uma diferença estatisticamente significativa;
4. Mastócitos quimase-positivos foram identificados pela primeira vez, através de imunofluorescência, na membrana pericárdica bovina, embora em número reduzido;
5. Foi identificada a presença de ECA no mesotélio, sugerindo esta camada ser uma possível fonte de produção desta enzima encontrada no líquido pericárdico.

7 REFERÊNCIAS

- Bautista, R.; Sánchez, A.; Hernández, J.; Oyekan, A.; Escalante, B. Angiotensin II type AT(2) receptor mRNA expression and renal vasodilatation are increased in renal failure. *Hypertension*; 38(3 Pt 2):669-73; 2001
- Berglund, E.; Sarnoff, S. J.; Isaacs, J. P. Ventricular function. Role of the pericardium in regulation of cardiovascular hemodynamics. *Circ. Res.* 3:133-139; 1955
- Bienenstock J, Befus D, Denburg J, Goto T, Lee T, Otsuka H, Shanahan F. Comparative aspects of mast cell heterogeneity in different species and sites. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* Vol. 77, n. 1-2, p. 126-9. 1985.
- Carey, R. M.; Siragy, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.*24(3):261-71; 2003
- Caughey, G. H. Mast cell chymases and tryptases: phylogeny, family relations and biogenesis. In: Caughey, G.H. (Ed.), *Mast Cell Proteases in Immunology and Biology*. Marcel Dekker, New York, pp. 305–329; 1995
- Caughey, G. H. New developments in the genetics and activation of mast cell proteases. *Mol Immunol.*; 38(16-18):1353-7; 2002
- Caughey, G. H.; Zerweck, E. H.; Vanderslice, P. Structure, chromosomal assignment, and deduced amino acid sequence of a human gene for mast cell chymase. *J Biol Chem.*; 266(20):12956-63; 1991
- Corde S, Mebazaa A, Gandolfini MP, Fitting C, Marotte F, Peynet J, Charlemagne D, Cavillon JM, Payen D, Rappaport L, Samuel JL. Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res.*81, n. 5, p. 679- 87. 1997
- Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Stagliano, N.; Donovan, M.; Woolf, B.; Robinson, K.; Jeyaseelan, R.; Breitbart, R. E.; Acton, S. A novel angiotensin-converting enzymelated carboxypeptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin (1–9). *Circ Res* 87:1–9; 2000
- Dusting, G. J.; Nolan, R. D.; Woodman, O. L.; Martin, T. J. Prostacyclin produced by the pericardium and its influence on coronary vascular tone. *Am J Cardiol.*20;52(2):28A-35A; 1983
- Dzau, V. J. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens.*; 7(12):933-6; 1989
- Erdos, E. G.; Skidgel, R. A. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: Farmer SG, ed. *The kinin system: handbook of immunopharmacology*. London: Academic Press; 112–141; 1997
- Farquharson, C. A.; Struthers, A. D. Gradual reactivation over time of vascular tissue angiotensin I to angiotensin II conversion during chronic lisinopril therapy in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.*; 39(5):767-75; 2002

- Franconi, G. M.; Graf, P. D.; Lazarus, S. C.; Nadel, J. A.; Caughey, G. H. Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret. *J Pharmacol Exp Ther.*; 248(3):947-51, 1989
- Frommherz, K. J.; Faller, B.; Bieth, J. G. Heparin strongly decreases the rate of inhibition of neutrophil elastase by α_1 -proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 266:15356-15362; 1991
- Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.*; 264(3):224-36; 2008
- Gibson, A. T.; Segal, M. B. A study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the probable mechanism of fluid formation. *J Physiol.*;277:367-77; 1978
- Gomes, R. A.; Teodoro, L. G.; Lopes, I. C.; Bersanetti, P. A.; Carmona, A. K.; Hial, V. Angiotensin-converting enzyme in pericardial fluid: comparative study with serum activity. *Arq Bras Cardiol.*;91(3):156-61, 172-8; 2008
- Goossens, G. H.; Jocken, J. W.; Blaak, E. E.; Schiffrers, P. M.; Saris, W. H.; van Baak, M. A. Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. *Hypertension.*; 49(3):542-7; 2007
- Guo, C.; Ju, H.; Leung, D.; Massaelli, H.; Shi, M.; Rabinovitch, M. A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest.*; 107:703–715; 2001
- Haller, H.; Park, J. K.; Lindschau, C.; Meyer, M.; Menne, J. Spotlight on renin: intrarenal renin-angiotensin system--important player of the local milieu. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 7(2):122-5; 2006
- Hesseldahl, H.; Larsen, J. F. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat.*;126(3):315-35; 1969
- Holt, J. P.; Rhode, E. A.; Kines, H. Pericardial and ventricular pressures. *Circ Res* 8:1171-290; 1960
- Holt, J. P. Ventricular end-diastolic volume and transmural pressure. *Cardiologia* 50:281-290; 1967
- Holt, J. P. The normal pericardium. *Am J Cardiol.*;26(5):455-65; 1970
- Horkay, F.; Szokodi, I.; Selmecci, L.; Merkely, B.; Kékesi, V.; Vecsey, T.; Vuolteenaho, O.; Ruskoaho, H.; Juhász-Nagy, A.; Tóth, M. Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid. *Life Sci.*;62(3):267-74; 1998
- Irani, A. A.; Schechter, N. M.; Craig, S. S.; DeBlois, G.; Schwartz, L. B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 83(12):4464-8; 1986

- Ishihara, T.; Ferrans V. J.; Jones, M.; Boyce, S. W.; Kawanami, O.; Roberts, W. C. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol.*;46(5):744-53; 1980
- Ishihara, T.; Ferrans V. J.; Jones, M.; Boyce, S. W.; Roberts, W. C. Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular bioprostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg.* May;81(5):747-57; 1981
- Jolly S, Detilleux J, Coignoul F, Desmecht D. Enzyme-histochemical detection of a chymase-like proteinase within bovine mucosal and connective tissue mast cells. *J Comp Pathol.* Vol. 122, n. 2-3, p. 155-62., 2000
- Kanbe, N.; Kurosawa, M.; Miyashi, Y.; Kanbe, M.; Kempuraj, D.; Tachimoto, H.; Saito, H. Carnoy's fixative reduces the number of chymase-positive cells in immunocytochemical staining of Cord-blood-derived human cultured mast cell. *Allergy*: 53: 981-985; 1998
- Kluge, T.; Hovig, T. The ultrastructure of human and rat pericardium. I. Parietal and visceral mesothelium. *Acta Pathol Microbiol Scand.*;71(4):529-46; 1967a
- Kluge, T.; Hovig, T. The ultrastructure of human and rat pericardium. II. Intercellular spaces and junctions. *Acta Pathol Microbiol Scand.*71(4):547-63; 1967b
- Kokkonen, J. O.; Lindstedt, K. A.; Kovanen, P. T. Role for chymase in heart failure: angiotensin II-dependent or -independent mechanisms? *Circulation*; 107(20):2522-4; 2003
- Kramkowski, K.; Mogielnicki, A.; Buczko, W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol.*; 57(4):529-39; 2006
- Kumar, R.; Singh, V. P.; Baker, K. M. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm.. *Trends Endocrinol Metab.*; 18(5):208-14; 2007
- Küther K, Audigé L, Kube P, Welle M. Bovine mast cells: distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques. *Cell Tissue Res.*293, n. 1, p. 111-9. 1998
- Kyuden, Y.; Ito, T.; Masaki, T.; Yorioka, N.; Kohno, N. TGF- β 1 induced by high glucose is controlled by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker on cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int*; 25:483-491; 2005
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*; 227(5259):680-5; 1970
- Leung, P. S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol.*; 580(Pt 1):31-7; 2007
- Leung, P. S.; Carlsson, P. O. Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas.*; 30(4):293-8; 2005
- Lutzelschwab, C.; Pejler, G.; Aveskogh, M.; Hellman, L. Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J. Exp. Med.* 185, 13-29; 1997

- Masaki, T.; Kimura, S.; Yanagisawa, M.; Goto, K. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation*.;84(4):1457-68; 1991
- Matavelli, L. C, Huang, J.; Siragy, H. M. Angiotensin AT₂ receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension*.; 57(2):308-13; 2011
- Maurer, F. W.; Warren, M. F.; Drinker, C. K. The composition of mammalian pericardial and peritoneal fluids. Studies of their protein and chloride contents, and the passage of foreign substances from the blood stream into these fluids. *Am J Physiol*, 129: 635 – 644; 1940
- Mebazaa, A.; Wetzel, R. C.; Dodd-o, J. M.; Redmond, E. M.; Shah, A. M.; Maeda, K.; Maistre, G.; Lakatta, E. G.; Robotham, J. L. Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac function. *Cardiovasc Res*.;40(2):332-42; 1998
- Mehta, P. K.; Griendling, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*.; 292(1):C82-97; 2007
- Miyazaki, M.; Takai, S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci*.;100(5):391-7; 2006
- Molenaar, P.; O'Reilly, G.; Sharkey, A.; Kuc, R. E.; Harding, D. P.; Plumpton, C.; Gresham, G. A.; Davenport, A. P. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium.. *Circ Res*;72(3):526-38; 1993
- Mutsaers, S. E. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*.;7(3):171-91; 2002
- Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*.;86(3):747-803; 2006
- Re, R. N. Mechanisms of disease: local renin-angiotensin-aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*.; 1(1):42-7; 2004
- Reilly, C. F.; Tewksbury, D. A.; Schechter, N. M.; Travis, J. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem*.; 257(15):8619-22; 1982
- Remington, S. J.; Woodbury, R. G.; Reynolds, R. A.; Matthews, B. W.; Neurath, H. The structure of rat mast cell protease II at 1.9-A resolution. *Biochemistry*. 27:8097-8105; 1988
- Rubinstein, I.; Nadel, J. A.; Graf, P. D.; Caughey, G. H. Mast cell chymase potentiates histamine-induced wheal formation in the skin of ragweed-allergic dogs. *J Clin Invest*.; 86(2):555-9; 1990
- Sakai, K.; Sigmund, C. D. Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep*.; 7(2):135-40; 2005

Schechter, N. M.; Choi, J. K.; Slavin, D. A.; Deresienski, D. T.; Sayama, S.; Dong, G.; Lavker, R. M.; Proud, D.; Lazarus, G. S. Identification of a chymotrypsin-like proteinase in human mast cells. *J Immunol.*; 137(3):962-70; 1986

Schechter, N. M.; Irani, A. M.; Sprows, J. L.; Abernethy, J.; Wintroub, B.; Schwartz, L. B. Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J Immunol.*; 145(8):2652-61; 1990

Skeggs, L.T.; Kahn, J. R.; Shumway, N. P. The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J Exp Med* v;103: 295-299; 1956

Sommerhoff, C. P.; Caughey, G. H.; Finkbeiner, W. E.; Lazarus, S. C.; Basbaum, C. B.; Nadel, J. A. Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol.*; 142(7):2450-6; 1989

Soós, P.; Juhász-Nagy, A.; Ruskoaho, H.; Hartyánszky, I.; Merkely, B.; Tóth, M.; Horkay, F. Locally different role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the pericardial fluid. *Life Sci.*;71(21):2563-73; 2002

Szokodi, I.; Horkay, F.; Kiss, P.; Selmecci, L.; Merkely, B.; Kékesi, V.; Vuolteenaho, O.; Leppäluoto, J.; Ruskoaho, H.; Juhász-Nagy, A.; Tóth, M. Characterization and stimuli for production of pericardial fluid atrial natriuretic peptide in dogs. *Life Sci.*;61(14):1349-59; 1997

Takai, S.; Shiota, N.; Yamamoto, D.; Okunishi, H.; Miyazaki, M. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci.*;58:591-597, 1996

Tiedemann, K. On the yolk sac of the cat. Endoderm and mesothelium. *Cell Tissue Res.*1;173(1):109-27; 1976

Tom, B.; Garrelds, I. M.; Scalbert, E.; Stegmann, A. P.; Boomsma, F.; Saxena, P. R.; Danser, A. H. ACE-versus chymase-dependent angiotensin II generation in human coronary arteries: a matter of efficiency? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23(2):251-6; 2003

Tonnesen, M. G.; Klempner, M. S.; Austen, K. F.; Wintroub, B. U. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest.*; 69(1):25-30; 1982

Touyz, R. M.; Berry, C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.*;35(9):1001-15; 2002

Towbin, H; Gordon, J. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods.*; 72(2):313-40; 1984

Urata, H.; Boehm, K. D.; Philip, A.; Kinoshita, A.; Gabrovsek, J.; Bumpus, F. M.; Husain, A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest.*; 91:1269-1281; 1993

Urata, H.; Healy, B.; Stewart, R. W.; Bumpus, F. M.; Husain, A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res.*; 66(4):883-90, 1990a

Urata, H.; Kinoshita, A.; Misono K. S.; Bumpus, F. M.; Husain, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem.*; 265(36):22348-57; 1990b

Urata, H.; Kinoshita, A.; Perez, D. M.; Misono, K. S.; Bumpus, F. M.; Graham, R. M.; Husain, A. Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem.*;266:17173-17179; 1991

Uvnäs B, Aborg CH, Bergendorff A. Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin-protein complex. *Acta Physiol Scand Suppl.*336, p. 1-26. 1970.

Vartio, T.; Seppä, H.; Vaheri, A. Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. *J Biol Chem.*; 256(1):471-7; 1981

Von Recklinghausen, F. V. Zur fettresorption. *Arch Pathol Anat.*; 24: 172-208; 1863

Wegelius O. The content of mast cells in the pleural membranes, pericardium and liver capsule of cattle and horse; a comparison with earlier observations and assays of heparin and of histamine in these tissues. *Acta Physiol Scand.* Vol. 35, n. 3-4, p. 365-70, 1956

Welle MM, Proske SM, Harvima IT, Schechter NM. Demonstration of tryptase in bovine cutaneous and tumor mast cells. *J Histochem Cytochem.* Vol. 43, n 11, p. 1139-44. 1995.

Widdop, R. E.; Jones, E. S.; Hannan, R. E.; Gaspari, T. A. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol.*; 140(5):809-24; 2003

Wintroub, B. U.; Schechter, N. B.; Lazarus, G. S.; Kaempfer, C. E.; Schwartz, L. B. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol.*; 83(5):336-9; 1984

Wolters, P. J.; Pham, C. T.; Muilenburg, D. J.; Ley, T. J.; Caughey, G. H. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 18551–18556; 2001

Yamada, M.; Ueda, M.; Naruko, T.; Tanabe. S.; Han, Y. S.; Ikura, Y.; Ogami, M.; Takai, S.; Miyazaki, M. Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int.*; 59:1374–1381; 2001