

Células Mesoteliais Pericárdicas Parietais: Fonte da Enzima Conversora de Angiotensina Existente no Líquido Pericárdico Bovino

Pericardial Parietal Mesothelial Cells: Source of the Angiotensin-Converting-Enzyme of the Bovine Pericardial Fluid

Ilcione Ribeiro de Sousa Filho, Isabela Cabral Cavicchioli Pereira, Lourimar José de Moraes, Livia das Graças Vieito Lombardi Teodoro, Maria Laura Pinto Rodrigues, Roseli Aparecida da Silva Gomes

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba MG – Brasil

Resumo

Fundamentos: Angiotensina II (Ang II), o hormônio efector primário do sistema renina-angiotensina (SRA), atuando em níveis sistêmicos ou locais, é produzida pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) sobre a angiotensina I. Embora diversos SRAs teciduais, como o SRA cardíaco, tenham sido descritos em muitos estudos, dados de um SRA no líquido pericárdico e sua origem não são ainda disponíveis. A Ang II localmente produzida tem efeitos parácrinos e autócrinos, induzindo a hipertrofia ventricular esquerda, fibrose, insuficiência e disfunção cardíacas. Devido às dificuldades inerentes à obtenção de líquido pericárdico humano, modelos experimentais apropriados são muito úteis para obter dados relativos às suas características bem como dos tecidos contíguos.

Objetivos: Obter evidências da presença de constituintes das vias de produção de Ang II no líquido pericárdico e no pericárdio parietal bovinos.

Métodos: Extratos brutos de líquido pericárdico bovino sem albumina (sobrenadantes), imunoprecipitados com anticorpo anti-ECA, foram submetidos a eletroforese (SDS-PAGE) e os géis corados com Coomassie Blue. Duplicatas dos géis foram sondadas com anticorpo anti-ECA. A detecção de ECA nas membranas pericárdicas foi realizada por imunofluorescência.

Resultados: A imunodeteção sobre as membranas de nitrocelulose mostrou uma isoforma de ECA com 146 KDa no líquido pericárdico bovino. Nas secções de membrana pericárdica, a ECA foi imunolocalizada na camada mesotelial.

Conclusões: A isoforma de ECA do líquido pericárdico bovino e do pericárdio parietal deve ser, pelo menos em parte, responsável pela produção de Ang II no espaço pericárdico, devendo ser considerada quando o SRA cardíaco for avaliado. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(5):425-431)

Palavras-chave: Sistema Renina-Angiotensina, Peptidil Dipeptidase A, Líquido Pericárdico, Hipertrofia Ventricular Esquerda, Bovinos.

Abstract

Background: Angiotensin II (Ang II), the primary effector hormone of the renin-angiotensin system (RAS), acts systemically or locally, being produced by the action of angiotensin-converting-enzyme (ACE) on angiotensin I. Although several tissue RASs, such as cardiac RAS, have been described, little is known about the presence of an RAS in the pericardial fluid and its possible sources. Locally produced Ang II has paracrine and autocrine effects, inducing left ventricular hypertrophy, fibrosis, heart failure and cardiac dysfunction. Because of the difficulties inherent in human pericardial fluid collection, appropriate experimental models are useful to obtain data regarding the characteristics of the pericardial fluid and surrounding tissues.

Objectives: To evidence the presence of constituents of the Ang II production paths in bovine pericardial fluid and parietal pericardium.

Methods: Albumin-free crude extracts of bovine pericardial fluid, immunoprecipitated with anti-ACE antibody, were submitted to electrophoresis (SDS-PAGE) and gels stained with coomassie blue. Duplicates of gels were probed with anti-ACE antibody. In the pericardial membranes, ACE was detected by use of immunofluorescence.

Results: Immunodetection on nitrocellulose membranes showed a 146-KDa ACE isoform in the bovine pericardial fluid. On the pericardial membrane sections, ACE was immunolocalized in the mesothelial layer.

Conclusions: The ACE isoform in the bovine pericardial fluid and parietal pericardium should account at least partially for the production of Ang II in the pericardial space, and should be considered when assessing the cardiac RAS. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(5):425-431)

Keywords: Renin-Angiotensin System; Peptidyl-Dipeptidase A; Pericardial Fluid; Hypertrophy Left Ventricular; Cattle.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Roseli Aparecida da Silva Gomes •
Praça Manoel Terra, 330. CEP 38025-015, Abadia, Uberaba, MG – Brasil
E-mail: bioq@dcb.uftm.edu.br

Artigo recebido em 16/01/2017, revisado em 26/06/2017, aceito em 12/07/2017

DOI: 10.5935/abc.20170155

Introdução

Doenças cardiovasculares são consideradas a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo.¹ Já está bem estabelecido que a desregulação ou a superexpressão do sistema renina-angiotensina (SRA) leva a uma variedade de efeitos vasculares danosos, contribuindo para a fisiopatologia das doenças cardiovasculares.² Angiotensina II (Ang II) é o hormônio efetor primário desse sistema, sendo produzida através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) sobre o seu substrato, a angiotensina I (Ang I).³⁻⁵ A Ang II pode atuar sistemicamente ou como um fator tecidual, produzido localmente. A Ang II tecidual exerce ações parácrinas e autócrinas, promovendo crescimento celular, apoptose, inflamação, estresse oxidativo e danos aos tecidos, levando a hipertrofia, fibrose, insuficiência e disfunção cardíacas.^{6,7} Os SRAs teciduais^{6,8} e intracelulares⁹ locais, como o SRA cardíaco, já estão descritos na literatura, embora pouco se saiba a respeito da presença de um SRA no líquido pericárdico e quais suas possíveis fontes. A Ang II, alguns fatores de crescimento e enzimas já foram identificados nesse líquido.¹⁰ Gomes et al.¹¹ mostraram atividade de ECA no líquido pericárdico humano e Bechtloff et al.¹² mostraram a presença da fração proteica da ECA no líquido pericárdico de pacientes com doença arterial coronariana. Entretanto, a fonte dessa enzima no líquido ainda permanece desconhecida.

Devido às dificuldades inerentes à obtenção de líquido pericárdico, o uso de modelos experimentais apropriados é fundamental. O coração está contido no interior de um saco fibrosseroso, o saco pericárdico, o qual apresenta um folheto mais interno, o pericárdico seroso, que delimita a cavidade pericárdica. O pericárdio seroso é constituído por um folheto visceral, inseparável do coração, e por um folheto parietal, contínuo ao visceral. O líquido pericárdico encontra-se no interior dessa cavidade.^{13,14}

Assim, a caracterização do líquido pericárdico bem como dos tecidos circundantes de modelos animais é essencial para que os resultados possam apresentar aplicabilidade de translação para os seres humanos, incluindo a fonte das macromoléculas desse líquido. O objetivo deste trabalho foi obter na membrana pericárdica parietal e no líquido pericárdico bovinos evidências da presença de constituintes das vias de produção de Ang II.

Métodos

Obtenção do líquido pericárdico e do pericárdio parietal bovinos

Foram utilizados fragmentos de membranas pericárdicas parietais de seis bovinos da raça Nelore (*Bos indicus* Linnaeus, 1758), bem como líquido pericárdico, coletados no frigorífico de Delta (Delta-MG), mediante autorização dos veterinários responsáveis. Os fragmentos de membranas pericárdicas obtidos foram lavados e acondicionados em solução salina a 4°C. Os líquidos pericárdicos, aspirados das cavidades pericárdicas com seringas estéreis de 20 mL, foram mantidos a 4°C e, juntamente com as membranas, transportados para o laboratório.

Este estudo, por se tratar de condições "ex vivo", não necessitou de parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) UFTM para sua execução (conforme Regulamento Interno da CEUA/UFTM, artigo 2, inciso I, §2º).

Processamento das membranas pericárdicas parietais

Fragmentos de membranas pericárdicas parietais foram lavados em salina e dissecados em fluxo laminar horizontal (Labconco, EUA), na presença de meio nutriente (DMEM), para retirada do tecido adiposo existente na camada epipericárdica do pericárdio parietal. A seguir, foram lavados em TBS e recortados, sendo obtidos fragmentos de aproximadamente 1,0x0,3 cm, os quais foram colocados em meio crioprotetor (OCT) e submetidos ao processo de fixação por congelamento em nitrogênio líquido. Após fixação, os fragmentos foram seccionados em criostato (Leica Microsystems). Secções de 2 µm obtidas foram colocadas em lâminas, fixadas em acetona por 10 minutos, e acondicionadas a -20°C.

Processamento do líquido pericárdico

O líquido pericárdico foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 14.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos (Centrifuge 5402, Eppendorf). Os sobrenadantes foram coletados e aqueles que apresentavam aspecto límpido, sem contaminação visual com sangue, foram utilizados, sendo então constituído um "pool" de líquido pericárdico.

A albumina presente no líquido pericárdico em concentrações elevadas foi reduzida pela 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, equilibrado 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, os extratos de líquido pericárdico foram centrifugados a 14.000 rpm, a 4°C, e os sobrenadantes coletados para posterior utilização.

Imunoprecipitação do líquido pericárdico

Amostras de 500 µL de líquido pericárdico, obtidas após a retirada de albumina, foram incubadas com 2,5 µL de anticorpo anti-ECA (200 µg/mL, Santa Cruz), durante a noite. Em seguida, 25 µL de esferas de Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences) conjugadas com proteína G foram adicionadas às amostras e incubadas por 2 horas. As suspensões foram centrifugadas por 5 minutos, a 14.000 rpm. Todos os procedimentos foram realizados sob agitação, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados coletados solubilizados com 20 µL de solução de amostra.¹⁵ Os imunocomplexos obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Os imunocomplexos obtidos foram solubilizados com solução de amostra em condições redutoras, aquecidos a 70°C, centrifugados e aplicados em géis com concentração de 7,5%. As bandas polipeptídicas foram separadas por SDS-PAGE (Mighty Small II SE 260, Amersham Biosciences), a uma corrente constante de 25 mA. Os géis obtidos foram

fixados, corados com azul de Coomassie e descorados. Duplicatas dos géis não fixadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Invitrogen), em cuba de transferência (TE 22 Amersham), contendo tampão Towbin modificado,¹⁶ sob agitação, durante a noite, a 4°C, com corrente constante de 200 mA. As membranas obtidas foram coradas com Ponceau S para verificar a presença das frações polipeptídicas, descoradas com água destilada, secas em papel de filtro e submetidas à imunodeteção de ECA.

Imunodeteção em membranas de nitrocelulose

As membranas de nitrocelulose foram incubadas com leite desnatado 10% e albumina bovina sérica 2% em salina tamponada com Tris (TBS), durante a noite, sob agitação, a 4°C, para bloquear ligações não específicas. Em seguida, essa solução foi substituída por solução contendo o anticorpo primário anti-ECA (200 µg/mL, Santa Cruz), diluído a 1:100, e as membranas foram incubadas por 2 horas. Após incubação com anticorpo primário, as membranas foram exaustivamente lavadas com TBS e incubadas com anticorpo secundário [F(ab')₂], anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase (Amersham), diluído a 1:1000, por 2 horas. As membranas foram novamente lavadas e as bandas imunorreativas foram reveladas em uma solução contendo diaminobenzidina (DAB, Dako). A revelação foi inativada em água destilada. Todos os anticorpos foram diluídos em uma solução constituída por albumina bovina sérica 1% e Tween 20 0,05% em TBS, sendo as incubações com os anticorpos realizadas à temperatura ambiente e sob agitação. Para se determinar a especificidade da reação, membranas foram incubadas sem a presença do anticorpo primário.

Imunofluorescência nas membranas pericárdicas parietais

As secções de pericárdio parietal obtidas após criomicrotomia foram lavadas em TBS e incubadas com anticorpo anti-ECA (200 µg/mL, Santa Cruz), por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida e escura. Após incubação com anticorpo primário, as secções foram lavadas em TBS mais Tween 20 0,05% diversas vezes e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com rodamina (Alexa Fluor Molecular Probes 568). Após serem exaustivamente lavadas, as secções montadas com Fluoromount G (Southern Biotech) foram observadas e documentadas em microscópio de fluorescência Olympus, em comprimento de onda de 568 nm. Para determinar a especificidade da imunocoloração, secções controle foram incubadas com omissão do anticorpo primário.

Resultados

Deteção da ECA no líquido pericárdico bovino

Quando os extratos brutos de fluido pericárdico foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-ECA e analisados por SDS-PAGE em condições redutoras, foi detectada uma banda com massa molecular aproximada de 146 kDa, semelhante à massa da ECA (Figura 1; seta). Dentre as bandas polipeptídicas observadas, a mais proeminente é a cadeia pesada de IgG, pois o anticorpo

não foi removido após ser adicionado ao fluido pericárdico durante a imunoprecipitação (Figura 1; cabeça de seta). Outras bandas menos espessas são também notadas e podem ter sido co-imunoprecipitadas ou mesmo não terem sido adequadamente removidas pelas lavagens com tampão. A imunoprecipitação de ECA do líquido pericárdico bovino foi confirmada através da imunodeteção nas membranas de nitrocelulose, que evidenciou a isoforma da ECA. A isoforma da ECA detectada encontra-se na posição esperada para a enzima (Figura 2; seta).

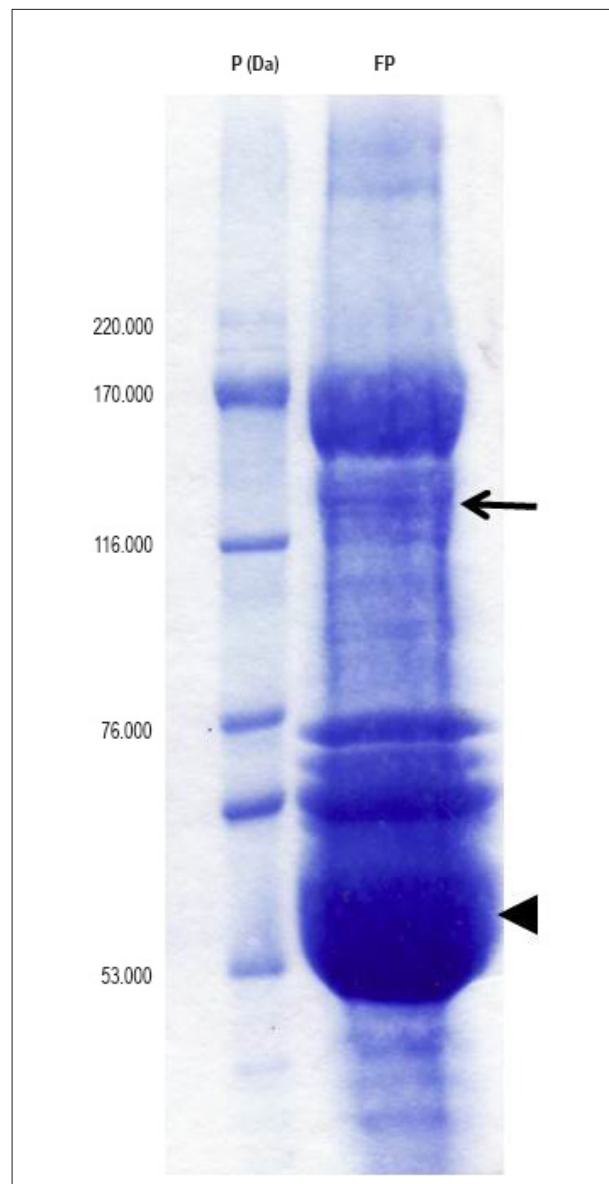


Figura 1 – SDS-PAGE de amostras do líquido pericárdico bovino imunoprecipitadas com anticorpo anti-ECA. Gel representativo (7,5%), corado por azul de Coomassie, onde observamos a presença de uma banda com massa molecular aparente de 146 kDa (seta), sugerindo ser uma isoforma de ECA. A cabeça de seta indica a cadeia pesada da IgG. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. FP: fluido pericárdico; P (Da): padrões de pesos moleculares.

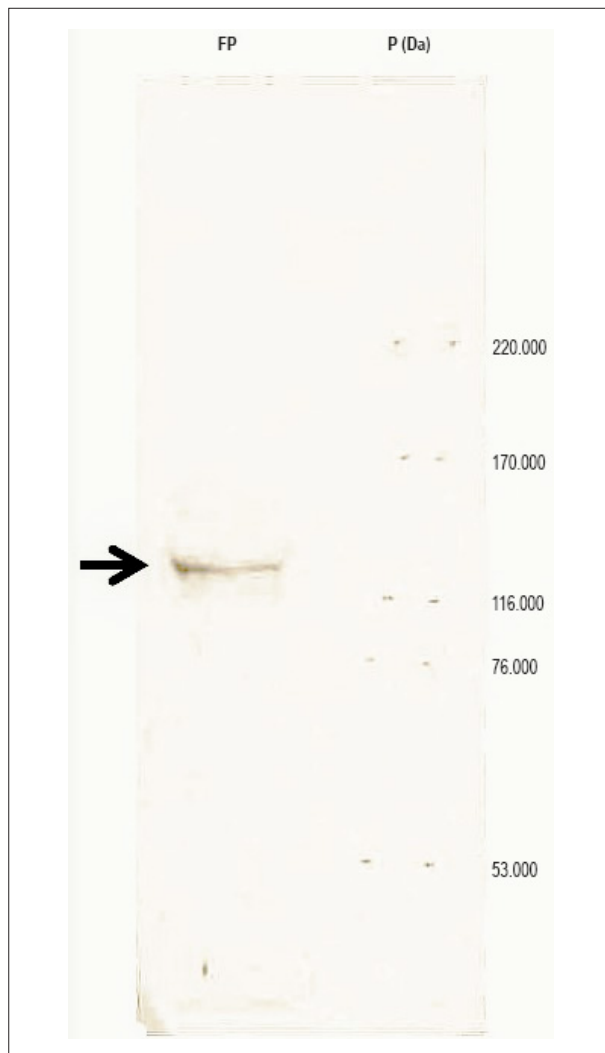


Figura 2 – Western Blot de amostras do líquido pericárdico bovino imunoprecipitadas com anticorpo anti-ECA. As frações polipeptídicas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose e sondadas com anticorpo anti-ECA. A seta indica a isoforma de ECA imunomarcada. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. FP: fluido pericárdico; P (Da): padrões de pesos moleculares.

Imunolocalização da ECA na membrana pericárdica

As secções histológicas de pericárdio parietal submetidas à detecção da ECA, através da técnica da imunofluorescência, mostraram, de maneira inequívoca, a marcação positiva para ECA nas células mesoteliais (Figura 3, à direita). Essa marcação não foi contínua em todo o mesotélio nem com a mesma intensidade. Fluorescência específica para ECA não foi observada na camada fibrosa da membrana pericárdica, exceto nos vasos sanguíneos, pois a ECA é expressa nas células endoteliais. Os controles negativos não apresentaram nenhuma coloração. À esquerda, secção histológica de pericárdio parietal corada por azul de toluidina.

Discussão

O presente estudo evidencia a presença de uma isoforma da ECA no líquido pericárdico bovino e estabelece a localização celular da ECA nas células mesoteliais da membrana pericárdica parietal bovina, pela primeira vez, indicando essa membrana como uma possível fonte da ECA existente no líquido pericárdico.

O SRA, originalmente caracterizado como um sistema endócrino circulante, compreende um número de vias enzimáticas e componentes bioativos que exercem ações funcionais diversas.

Evidências abundantes, atualmente, revelam também a presença de SRAs teciduais que influenciam em ações celulares locais e exibem componentes intracelulares e subcelulares.¹⁷⁻²⁰ SRAs locais foram demonstrados em muitos tecidos/órgãos, entre eles o coração, os rins, as glândulas adrenais, os vasos sanguíneos, o pâncreas, o fígado, o cérebro e o tecido adiposo.^{6,19,21-24} Particularmente em relação ao SRA cardíaco, diversos constituintes desse sistema, como o angiotensinogênio, a renina, a ECA, a Ang I e a Ang II e os receptores AT1 e AT2, foram detectados em diferentes regiões do coração, entre elas os átrios, o sistema de condução, as valvas, os vasos coronários e os ventrículos, e são sintetizados por diferentes tipos celulares, como os fibroblastos e os miócitos.^{6,24-26}

A importância do pericárdio e do fluido pericárdico no controle da função cardíaca tem sido estabelecida nos últimos anos. A natureza quiescente do pericárdio visceral e do parietal tem sido questionada, com evidências para 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.^{27,28} Assim, a caracterização do pericárdio bovino, principalmente das macromoléculas e mediadores produzidos pelas células que delimitam a cavidade pericárdica, é fundamental para se entender melhor a biologia e a importância dessa membrana bem como do líquido pericárdico, em condições fisiológicas ou associadas a alguma doença.

O líquido pericárdico é considerado um ultrafiltrado do plasma, adicionado de componentes do fluido intersticial miocárdico. Sua concentração proteica é menor do que a do plasma, mas com uma concentração de albumina relativamente elevada.¹⁴ Substâncias já detectadas no líquido pericárdico humano ou no de animais, como a endotelina-1, o fator de crescimento de fibroblastos β (bFGF), a Ang II, a renina, o fator natriurético atrial, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a interleucina-6, moléculas de adesão celular entre outras, poderiam exercer seus efeitos sobre o coração.^{10,29-31} A modulação do crescimento e a sobrevivência de miócitos cardíacos,¹⁰ de células endoteliais e de células musculares lisas^{32,33} são alguns dos efeitos biológicos dos mediadores existentes no líquido pericárdico de pacientes com doenças cardíacas isquêmicas e não

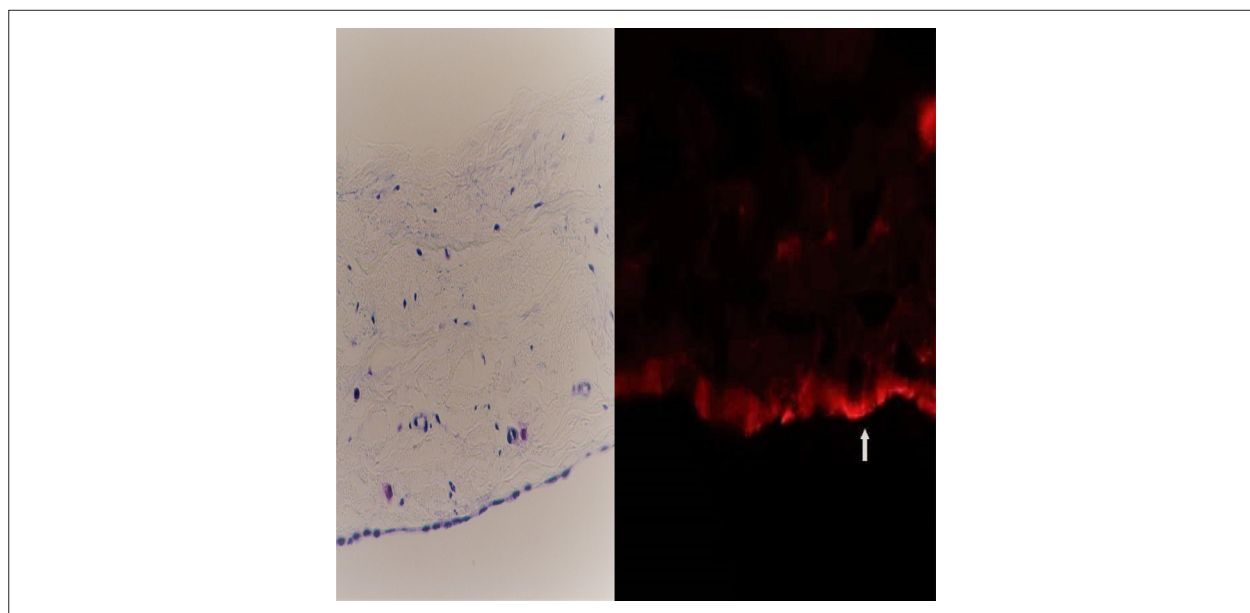


Figura 3 – À direita, imagens representativas de seções de membranas pericárdicas parietais bovinas, fixadas por congelamento e submetidas à imunodeteção de ECA. Notar a positividade da marcação na camada mesotelial (seta). À esquerda, seção histológica de pericárdio parietal bovino corada por azul de toluidina. Aumentos originais: 40x.

isquêmicas. Limana et al.³⁴ mostraram que, em resposta ao infarto do miocárdio, células epicárdicas c-kit⁺ reativam um programa embrionário e fatores solúveis existentes no líquido pericárdico desempenham um papel fundamental nesse evento. Assim, conhecer a composição desse líquido tem importância fisiopatológica e significância diagnóstica.³⁰

Nossos resultados evidenciaram a presença de uma isoforma de ECA no líquido pericárdico bovino, mostrando a existência de parte do SRA na cavidade pericárdica, provavelmente com origem local. Embora o líquido pericárdico seja um ultrafiltrado do plasma e os mediadores existentes no plasma, como a Ang II, possam se difundir para o líquido pericárdico sem nenhuma restrição, o mesmo não acontece com a ECA. A organização estrutural da camada mesotelial do pericárdio, tanto parietal como visceral, impediria essa livre circulação. A presença de junções de oclusão entre as células mesoteliais^{27,28,35} não permite o trânsito paracelular de macromoléculas com massa molecular acima de 40 kDa.³⁶ Como a isoforma da ECA presente no líquido pericárdico bovino apresenta massa molecular aproximada de 146 kDa, semelhante à massa molecular prevista da ECA humana,⁵ a rota paracelular não seria uma via de acesso à cavidade pericárdica.

Além dos fatores acima citados que, em parte, respaldam uma síntese local de ECA, a localização da ECA também deve ser considerada. A imunofluorescência evidenciou uma marcação positiva nas células mesoteliais pericárdicas parietais e nos vasos sanguíneos existentes na membrana pericárdica. A imunolocalização da ECA nos vasos sanguíneos já era esperada, pois a ECA apresenta distribuição ubíqua no endotélio.^{5,37} Já nas células mesoteliais, a imunolocalização é um forte indício de que essas células sejam a fonte da

ECA existente no líquido pericárdico, pois: *i*) apresentam uma íntima relação anatômica com a cavidade pericárdica, pois delimitam-na; *ii*) a ECA é uma proteína integral de membrana, sendo portanto produzida pelas células mesoteliais, com seu domínio extracelular estando voltado para a cavidade pericárdica;⁵ *iii*) a capacidade das células mesoteliais sintetizarem a ECA foi demonstrada pela presença do RNAm dessa enzima em células mesoteliais peritoneais humanas em cultura, através de RT-PCR;³⁸ *iv*) apresentam retículo endoplasmático abundante e complexo de Golgi desenvolvido,^{27,28,35} consistentes com o perfil de células que realizam uma ativa síntese proteica.

Corroborando esses argumentos, diversos trabalhos têm demonstrado o perfil metabólico das células mesoteliais. As células mesoteliais sintetizam e secretam lubrificantes, incluindo glicosaminoglicanos e surfactante para prevenir a fricção e a formação de adesões entre as superfícies parietal e visceral.³⁹ Elas desempenham um papel crítico na manutenção da homeostase das membranas serosas em resposta a lesão, inflamação e imunorregulação.³⁹ As células mesoteliais também têm papel central na reparação das serosas, na secreção de mediadores inflamatórios, quimiocinas, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. Apresentam diferentes fenótipos, os quais, dependendo de sua localização e estado de ativação, refletem diferenças funcionais.³⁹

A importância de SRA locais ainda não está bem esclarecida. A presença de mediadores cardiovasculares ativos em maiores concentrações no líquido pericárdico do que no plasma suscita questão sobre suas origens e suas possíveis ações nos tecidos circundantes. Líquido pericárdico de pacientes com doença arterial coronariana desencadeiam

contrações arteriais substanciais em artérias carótidas de rato isoladas, as quais são mediadas primariamente pela ET-1.⁴⁰ Nossos resultados mostraram a presença de uma isoforma de ECA no líquido pericárdico e a imunolocalização, pela primeira vez, dessa proteína nas células mesoteliais parietais pericárdicas, sugerindo a camada mesotelial pericárdica parietal como uma das possíveis fontes da ECA existente no líquido pericárdico. Assim, a Ang II produzida localmente poderia atuar nas próprias células mesoteliais pericárdicas, tanto parietais como viscerais, ou ainda diretamente no miocárdio, promovendo a inflamação, o estresse oxidativo e a morte celular, contribuindo para a hipertrofia e fibrose cardíacas. Além disso, poderia atuar diretamente sobre a microcirculação miocárdica promovendo efeitos vasomotores importantes. Nessa visão, o líquido pericárdico representaria um importante reservatório de mediadores que poderiam modular as funções das células cardíacas.

A utilização de modelos experimentais com tecidos semelhantes aos tecidos humanos, em organização estrutural e em constituição celular, seria mais adequada para o estudo de determinadas condições humanas. Além da organização estrutural, as caracterizações bioquímica e molecular são condições fundamentais para a obtenção de um balanço ótimo entre a quantidade e a qualidade dos dados produzidos e sua relevância para a condição investigada.

As características estruturais da camada mesotelial pericárdica bovina, semelhantes à humana,^{27,28} sugerem que nossos resultados possam ser estendidos às células mesoteliais pericárdicas humanas, sendo essas a possível fonte de parte da ECA existente no líquido pericárdico humano.^{11,12} Uma melhor compreensão dos constituintes do líquido pericárdico bem como das células mesoteliais em modelos animais adequados poderia ajudar no entendimento dos efeitos parácrinos ou autócrinos dos mediadores produzidos pelo pericárdio sobre o coração.

Entre as limitações de nosso estudo deve ser considerado o volume de líquido pericárdico obtido dos animais que constituíram nossa amostra. Devido às dificuldades inerentes

a obtenção de líquido pericárdico, inclusive bovino, esse volume foi relativamente pequeno. Assim, mais pesquisas são necessárias para investigar como as células mesoteliais interagem com seu meio ambiente local e qual a sua real contribuição na produção de mediadores existentes no líquido pericárdico que possam modular ações celulares fundamentais para a manutenção da homeostase cardíaca.

Conclusões

A Ang II presente no líquido pericárdico bovino é produzida, em parte, pela ação da ECA existente nesse líquido, sendo as células mesoteliais pericárdicas parietais uma das fontes dessa ECA.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Sousa Filho IR, Teodoro LGVL, Rodrigues MLP, Gomes RAS; Obtenção de dados: Sousa Filho IR, Pereira ICC, Morais LJ, Rodrigues MLP; Análise e interpretação dos dados: Sousa Filho IR, Pereira ICC, Rodrigues MLP; Obtenção de financiamento e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Teodoro LGVL, Rodrigues MLP, Gomes RAS; Redação do manuscrito: Sousa Filho IR, Pereira ICC, Morais LJ, Teodoro LGVL, Rodrigues MLP, Gomes RAS.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela CAPES e FAPEMIG n. APQ 01650/2008.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Ilione Ribeiro de Sousa Filho pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Referências

1. World Health Organization. (WHO). Global atlas on cardiovascular diseases prevention and control. Geneva; 2011.
2. Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture - Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*. 2001;37(4):1047-52. PMID: 11304501.
3. Acharya KR, Sturrock ED, Riordan JF, Ehlers MR. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(11):891-902. doi: 10.1038/nrd1227.
4. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol*. 2003;4(8):225. doi: 10.1186/gb-2003-4-8-225.
5. Bernstein KE, Ong FS, Blackwell WL, Shah KH, Giani JF, Gonzalez-Villalobos RA, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol Rev*. 2012;65(1):1-46. doi: 10.1124/pr.112.006809.
6. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86(3):747-803. doi: 10.1152/physrev.00036.2005.
7. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):482-90. doi: 10.1093/cvr/cvn333.
8. Re RN. Mechanisms of disease: local renin-angiotensin-aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2004;1(1):42-7. doi: 10.1038/ncpcardio0012.
9. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(5):208-14. doi: 10.1016/j.tem.2007.05.001.
10. Corda S, Mebazaa A, Gandolfini MP, Fitting C, Marotte F, Peynet J, et al. 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*. 1997;81(5):679-87. PMID: 9351441.

11. Gomes RA, Teodoro Ld, Lopes IC, Bersanetti PA, Carmona AK, Hial V. Angiotensin-converting enzyme in pericardial fluid: comparative study with serum activity. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(3):156-61, 172-8. PMID: 18853057. Erratum in: *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(6):442.
12. Bechtloff R, Goette A, Bukowska A, Kähne T, Peters B, Huth C, et al. Gender and age-dependent differences in the bradykinin-degradation within the pericardial fluid of patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2011;146(2):164-70. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.06.028.
13. Michailova KN, Usunoff KG. Serosal membranes (Pleura, Pericardium, Peritoneum): normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2006;83:i-vii, 1-144. PMID: 16570866.
14. Holt JP. The normal pericardium. *Am J Cardiol.* 1970;26(5):455-65. PMID: 4991283.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5. PMID: 5432063.
16. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods.* 1984;72(2):313-40. PMID: 6206159.
17. Abadir PM, Walston JD, Carey RM. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides.* 2012;38(2):437-45. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.016.
18. Carey RM. Functional intracellular renin-angiotensin systems: potential for pathophysiology of disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302(5):R479-81. doi: 10.1152/ajpregu.00656.2011.
19. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3):251-87. doi: 10.1124/pr.59.3.3.
20. Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, Baker KM. The intracrine renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond).* 2012;23(5):273-84. doi: 10.1042/CS20120089.
21. Baltatu OC, Campos LA, Bader M. Local renin-angiotensin system and the brain--a continuous quest for knowledge. *Peptides.* 2011;32(5):1083-6. doi: 10.1016/j.peptides.2011.02.008.
22. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003;24(3):261-71. doi: 10.1210/er.2003-0001.
23. Cheng Q, Leung PS. An update on the islet renin-angiotensin system. *Peptides.* 2011;32(5):1087-95. doi: 10.1016/j.peptides.2011.03.003.
24. Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system conceptual or a regulator of cardiac function. *Circ Res.* 1999;85(7):643-50. PMID: 10506489.
25. Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt R. A comparative study of the distribution of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology.* 1987;120(6):2334-8. doi: 10.1210/endo-120-6-2334.
26. Hellmann W, Suzuki F, Ohkubo H, Nakanishi S, Ludwig G, Ganten D. Angiotensinogen gene expression in extrahepatic rat tissues: application of a solution hybridization assay. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;338(3):327-31. PMID: 3194040.
27. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol.* 1980;46(5):744-53. PMID: 7435384.
28. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC. Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular bioprostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1981;81(5):747-57. PMID: 7218840.
29. Namiki A, Kubota T, Fukazawa M, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J, et al. Endothelin-1 concentrations in pericardial fluid are more elevated in patients with ischemic heart disease than in patients with nonischemic heart disease. *Jpn Heart J.* 2003;44(5):633-44. PMID: 14587645.
30. Fujita M, Komeda M, Hasegawa K, Kihara Y, Nohara R, Sasayama S. Pericardial fluid as a new material for clinical heart research. *Int J Cardiol.* 2001;77(2-3):113-8. PMID: 11182172.
31. Mebazaa A, Wetzel RC, Dodd-o JM, Redmond EM, Shah AM, Maeda K, et al. Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac function. *Cardiovasc Res.* 1998;40(2):332-42. PMID: 9893727.
32. Iwakura A, Fujita M, Hasegawa K, Sawamura T, Nohara R, Sasayama S, et al. Pericardial fluid from patients with unstable angina induces vascular endothelial cell apoptosis. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(7):1785-90. PMID: 10841225.
33. Yoneda T, Fujita M, Kihara Y, Hasegawa K, Sawamura T, Tanaka T, et al. Pericardial fluid from patients with ischemic heart disease accelerates the growth of human vascular smooth muscle cells. *Jpn Circ J.* 2000;64(7):495-8. PMID: 10929776.
34. Limana F, Bertolami C, Mangoni A, Di Carlo A, Avitabile D, Mocini D, et al. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(4):609-18. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.008.
35. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology.* 2002;7(3):171-91. PMID: 12153683.
36. Page E, Upshaw-Earley J, Goings G. Permeability of rat atrial endocardium, epicardium, and myocardium to large molecules. Stretch-dependent effects. *Circ Res.* 1992;71(1):159-73. PMID: 1376644.
37. Hial V, Gimbrone MA Jr, Peyton MP, Wilcox GM, Pisano JJ. Angiotensin metabolism by cultured human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Microvasc Res.* 1979;17(3 Pt 1):314-29. PMID: 223017.
38. Kyuden Y, Ito T, Masaki T, Yorioka N, Kohno N. Tgf-beta1 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.* 2005;25(5):483-91. PMID: 16178483.
39. Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim CB, Prêle CM. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol.* 2015;6:113. doi: 10.3389/fphar.2015.00113.
40. Nemeth Z, Cziraki A, Szabados S, Horvath I, Koller A. Pericardial fluid of cardiac patients elicits arterial constriction: role of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(9):779-85. doi: 10.1139/cjpp-2015-0030.