

"CLEARING FACTOR" PANCREÁTICO¹

HELION PÓVOA JR.,* NEUSA MARCONDES,** JORGE M. OLIVEIRA

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil.

(Com 5 figuras)

SUMÁRIO: Dosou-se o "clearing factor" (lipase lipoproteica), em pâncreas de ratos normais após serem submetidos a algumas condições experimentais. As seguintes conclusões podem ser extraídas:

- a) O pâncreas é o órgão mais rico nesta enzima (8 vezes mais que o tecido adiposo, até então considerado o mais rico em CF);
- b) O jejum total de 48 horas diminui significativamente a atividade de CF;
- c) O complamin, um derivado do ácido nicotínico, agindo sobre a arteriosclerose experimental, não afeta a atividade da enzima;
- d) O ácido épsilon-aminocapróico (AEAC) potente antagonista da heparina, inibe a atividade do CF pancreático;
- e) Ratos com arteriosclerose experimental apresentam níveis diminuídos desta enzima no pâncreas.

O "clearing factor" (CF) ou lipase lipoprotéica foi descoberto por Hahn, o qual observou que cães com hiperlipemia alimentar, quando transfundidos com sangue contendo heparina, não mais apresentavam o plasma turvo e sim límpido⁽¹⁾.

Este "clareamento" foi também produzido "in vitro" quando o plasma de um animal, previamente injetado com heparina, foi misturado com plasma lipêmico. O termo "clearing factor" foi introduzido para indicar a presen-

ça no plasma de um componente ativo sobre os quilomícrons; ele atua através de um processo lipolítico, acompanhado por hidrólise dos componentes triglicéridos das partículas lipídicas, havendo, na primeira fase do clareamento, um acúmulo de monoglicéridos⁽²⁾ ⁽³⁾.

O mecanismo foi posteriormente elucidado quando se observou que o ácido graxo liberado se combinava com a albumina. Os substratos desta enzima, no plasma, são principal-

¹ Entregue para publicação em 20 de setembro de 1973.

* Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz.

** Farmacêutico do Instituto Oswaldo Cruz.

Trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química e Terapêutica Experimental do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Caixa Postal, 926 — GB — Brasil.

mente os quilomícrons e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (very low density lipoproteins) (4).

O CF apresenta o máximo de atividade a 37°C e pH 7,2 — 7,6. É inibido pelo cloreto de sódio 0,7 M, assim como pela protamina e sais biliares (2) (3).

A demonstração de alterações nos lipídeos sangüíneos, após a injeção de heparina, atraiu a atenção de inúmeros pesquisadores interessados em estados clínicos relacionados com o metabolismo lipídico, em especial, a arteriosclerose (3).

Indivíduos com cirrose de Laennec apresentam um CF aumentado, demonstrando a possibilidade de o fígado agir inativando esta enzima (5).

Portadores de arteriosclerose possuem um CF bem baixo. Em sobreviventes de infarto do miocárdio, o CF está diminuído, assim como em casos de nefrose lipóidica (2) (3) (6). O mesmo se observa em indivíduos jovens com obesidade, havendo uma elevação significativa após a volta ao peso normal (2) (7).

A hiperlipemia idiopática (hiperquilomicronemia ou hiperlipoproteíemia tipo I de Fredrikson) parece ser um defeito genético de síntese do CF, o que explica a deficiente remoção de triglicerídeos do plasma destes indivíduos. Após a injeção de heparina, a mobilização de CF se faz de maneira precária nestes casos (8) (9).

Em animais tratados com glicocorticóides, parece haver liberação de um inibidor do CF (10) (11) (12).

Todavia, não encontramos, em trabalhos anteriores, valores alterados

desta enzima no plasma de animais adrenalectomizados (13) ou após jejum prolongado (14).

Esta enzima foi, outrossim, demonstrada em pós-acetônicos de vários tecidos. Existe elevada atividade no coração que é inibida por antibióticos. O pulmão e tecido adiposo são também muito ricos nesta enzima (3).

O jejum provoca aumento da atividade do "clearing factor" no miocárdio do rato, embora baixe a atividade da enzima no tecido adiposo (3) (4). Também o "Stress" e a injeção de dexametozana causam baixa significativa neste último (15) (16).

O CF foi descrito no rim, sendo este estudo de grande importância fisiológica, já que inúmeras doenças renais apresentam distúrbios no metabolismo lipídico. Parece existir o CF na medula renal e uma lipase diferente no córtex (2) (3).

Muito interessantes também são os achados concernentes à atividade da enzima na glândula mamária. Imediatamente antes do parto, o CF desta glândula atinge níveis altos, assim permanecendo durante a lactação (3).

O estudo da atividade lipolítica da parede vascular apresenta grande interesse, já que se sabe que na arteriosclerose existe acúmulo de gorduras neste local. A existência de atividade acentuada na parede vascular (inclusive na superfície endotelial dos capilares) levanta a possibilidade da existência de um mecanismo protetor no vaso impedindo a deposição lipídica.

Pudemos observar anteriormente a existência desta enzima no sêmen humano normal. Neste líquido, verifica-

mos também que os ácidos graxos livres se acham em concentração elevada (17).

Nosso interesse em dosar o CF no pâncreas foi despertado por vários fatores. As experiências de LANSING que conseguiu proteger animais da arteriosclerose experimental por injeção de extratos pancreáticos ricos em elastase, despertaram nossa curiosidade. Convém frisar que o pâncreas é a principal fonte de elastase no organismo (8) (18).

LANGER demonstrou que estes extratos provocam normalização do lipidograma em homens (19). LOEVEN observou que o CF faz parte do complexo enzimático que é a elastase (20). Este mesmo autor provou mais recentemente que o teor de elastase pancreática acha-se significativamente diminuído em indivíduos com arteriosclerose (21).

Estes achados juntamente com a total falta de dados na literatura mundial concernentes à dosagem do CF no pâncreas, levaram-nos à realização deste trabalho que pode dividir-se em partes.

Primeiramente, estabeleceremos os valores de CF pancreático em ratos normais, confrontando-os com os de outros tecidos (especialmente com o tecido adiposo, o mais rico em CF).

Em segundo lugar, estudaremos a ação de drogas (que atuem sabidamente na arteriosclerose experimental) sobre o CF.

O complamin, o 7-[2-hidroxi-3 (2-hidroxietil) -metilaminopropil] teofila, um derivado do ácido nicotínico,

que age protegendo animais da arteriosclerose experimental, será estudado (22).

O ácido épsilon-aminocapróico (AEAC), outra droga a ser estudada, além de antagonista da heparina (23) parece ter ação aterogênica em coelhos (24). Além disto, inibe a elastase (25).

Como já é sabida a influência do jejum sobre o CF em outros órgãos (2) (3), achamos interessante descrever a ação da restrição total de alimentos sobre a atividade desta enzima no pâncreas.

Finalmente os achados de Lansing e Loeven nos levaram ao estudo do teor de CF em pâncreas de ratos com arteriosclerose experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos um total de 317 ratos Wistar (pesando aproximadamente 200 gramas) em nossas experiências. Foram divididos em 5 grupos:

a) *Normais*: 43 ratos normais foram estudados, dosando-se o CF no pâncreas e tecido adiposo.

Eram sacrificados e o tecido rapidamente extraído em éter-acetona gelado (1:1), segundo a técnica de Robinson (4). A atividade do "clareamento" era determinada a 37°C, segundo Baker(5). A inclinação da curva de densidade óptica representada contra o tempo de incubação em minutos (K) foi usada para medir-se a atividade enzimática.

b) Um segundo grupo incluiu ratos com complamin (10 ratos injetados e 31 normais). A injeção de 50 mg. por via intraperitoneal, era feita 24 horas antes de sacrificar-se o animal. A extração e dosagem se faziam do mesmo modo como relatado no item a).

c) Um terceiro grupo incluiu 161 ratos tratados com AEAC. A injeção de 50-200 mg

por via intraperitoneal, fazia-se 6-120 horas antes de sacrificar-se o animal e remover a glândula.

d) Um quarto grupo incluiu 92 ratos, nos quais se fazia uma total retirada de alimentos (com ingestão "ad libitum" de água) durante 24-96 horas. O animal após o período de jejum, era sacrificado e o pâncreas extraído.

e) Um último grupo foi feito com 25 animais, em 9 dos quais se administrou um regime rico em colesterol e aterogênico⁽²⁶⁾. Durante 3 meses, os ratos foram alimentados "ad libitum" com a seguinte dieta: colesterol 5,0 g, propiltiuracil 0,3 g, colato de sódio 2,0 g, caseína 20,0 g, misturas de sais e vitaminas 6,0 g, açúcar 20,5 g e manteiga 40,0 g, cloreto de sódio 0,2 g.

Após este período, eram sacrificados e o pâncreas removido. Estudos histológicos comprovaram a ação aterogênica e trombogênica da dieta.

RESULTADOS

Os resultados acham-se expressos nas Tabelas 1-5.

A Tabela 1 representa valores de CF em tecidos normais. Surpreendentemente, os valores encontrados no pâncreas são muito mais elevados que no tecido adiposo, sugerindo a possibilidade de um papel fisiológico de relevância desta enzima neste órgão.

Na Tabela 2, acham-se representados os valores de CF em pâncreas de ratos previamente injetados com complamin (derivado do ácido nicotínico) de ação já conhecida sobre a arteriosclerose experimental. Contudo, esta droga não atua sobre esta enzima pancreática, já que usando-se o teste *t* de Student, obtivemos uma diferença que não é estatisticamente significativa: $t = 1,0$ $p > 0,1$ (Não significativo).

TABELA 1

Comparação da atividade do "Clearing Factor" em tecidos de ratos normais.

	N.º de ratos	K*
Tecido Adiposo	12	0,221 ± 0,058
Pâncreas	31	1,926 ± 1,42

* Média aritmética ± Desvio padrão.

TABELA 2

"Clearing Factor" de Ratos injetados com Complamin

	N.º de Ratos	K*	t	Probabilidade
Normais	31	1,926 ± 1,42	—	>0,1
Complamin	10	1,505 ± 0,98	1,0	NS**

* Média aritmética ± Desvio padrão.

** Não significativo.

Na Tabela 3, acham-se representados os valores de CF em pâncreas de ratos previamente injetados com AEAC em doses variando de 50 — 200 mg. O intervalo da injeção da droga até a retirada do pâncreas variou de 6-120 horas.

Os resultados demonstram que o AEAC é um potente inibidor do CF. De fato, a não ser no grupo (II) ao qual administrado AEAC em pequenas doses (50 mg), 24 horas antes da extração do pâncreas, em que não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos normais ($t = 0,8, > 0,1$), em todos os outros 13 grupos (III-XV), a diminuição de atividade da lipase lipoprotéica foi significativa, como se pode observar na Tabela 3.

Na Tabela 4, representa dados obtidos com animais em jejum completo em tempos variáveis de 24-96 horas antes da retirada do pâncreas. Os animais submetidos a um jejum de 24 horas (grupo II), apresentam um CF diminuído, embora sem significação estatística ($t = 1,89, p > 0,05$). O mesmo não ocorre no grupo III (48 horas de jejum) onde o CF atinge a um nadir com uma taxa bem diminuída, de significação estatística evidente ($t = 3,3, p < 0,05$).

Após um jejum de 72-96 horas, o CF pancreático apresenta níveis iguais àqueles encontrados nos ratos normais.

Na Tabela 5, observamos que ratos com arteriosclerose experimental apresentam um CF pancreático estatisticamente diminuído.

TABELA 3
AEAC e "Clearing Factor" no Pâncreas de Ratos

Grupo	Intervalo (horas)	Nº de Ratos	Dose (mg)	K*	t	Probabilidades
I	—	10	Controles	1,6336 ± 0,70	—	—
II	24	15	50	1,4944 ± 0,88	t = 0,8	NS**
III	48	10	"	0,5232 ± 0,10	t = 4,0	<0,001
IV	72	10	"	0,3504 ± 0,19	t = 5,0	<0,001
V	96	10	"	0,3876 ± 0,28	t = 4,9	<0,001
VI	120	10	"	0,7344 ± 0,25	t = 3,2	<0,010
VII	24	15	100	0,3192 ± 0,20	t = 4,9	<0,001
VIII	48	10	"	0,4064 ± 0,10	t = 4,9	"
IX	72	9	"	0,3120 ± 0,16	t = 5,1	"
X	96	10	"	0,3840 ± 0,12	t = 5,0	"
XI	6	10	200	0,5432 ± 0,14	t = 4,0	"
XII	24	10	"	0,4840 ± 0,16	t = 4,5	"
XIII	48	10	"	0,3320 ± 0,11	t = 5,0	"
XIV	72	10	"	0,3480 ± 0,12	t = 5,0	"
XV	96	10	"	0,2328 ± 0,08	t = 5,2	"

* Média aritmética ± Desvio padrão.

** Não significativo.

TABELA 4

'Clearing Factor" no Pâncreas de Ratos após jejum

Grupo	Tempo	Nº de Ratos	K*	t	Probabilidades	
I	Normais	—	31	1,926 ± 1,420	—	—
II	Jejum	24 horas	17	1,338 ± 0,740	t = 1,89	NS**
III	"	48 "	10	0,990 ± 0,304	t = 3,30	<0,05
IV	"	72 "	10	2,500 ± 1,440	t = 1,10	NS**
V	"	96 "	24	2,110 ± 1,440	t = 0,40	NS**

* Média aritmética ± Desvio padrão.

** Não significativo.

TABELA 5

"Clearing Factor" no Pâncreas de Ratos com Arteriosclerose Experimental

Grupos	K*	t	Probabilidade
Normais	16	1,452 ± 0,67	—
Arteriosclerose	9	0,450 ± 0,40	t = 4,3 <0,001

* Média aritmética ± Desvio padrão.

DISCUSSÃO

Vários tecidos são ricos em "clearing factor" (CF) tissular: rim, miocárdio e tecido adiposo. Este último, mercê de sua importante função no metabolismo lipídico, era considerado o mais rico em CF, até neste nosso trabalho.

Com efeito, o tecido adiposo desempenha papel fundamental na captação dos ácidos graxos dos triglicerídeos dos quilomícrons e VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade). Desde que estas macromoléculas não podem penetrar através do endotélio capilar do tecido adiposo, são hidrolisadas pelo CF deste, já que se localiza no endotélio capilar (8).

Os ácidos graxos livres penetram no adipócito e se transformam no complexo ácido-graxo-coenzima A que, ao reagir com o L-glicerolfosfato (formado a partir do glicogênio ou glicose, visto que o tecido adiposo não possui glicerol-quinase), formará triglicerídeos.

Observamos, contudo, que o pâncreas é bem mais rico em CF que o tecido adiposo (8 vezes) sugerindo que deva desempenhar papel fisiológico de relevância neste órgão. Aliás, LANSING e LOEVEN (8) (18) (19) mostraram anteriormente o papel protetor desempenhado pela elastase contra a arteriosclerose, assim como, também, que o pâncreas é a grande

fonte de elastase nos organismos superiores.

O achado de valores diminuídos de elastase em pâncreas de indivíduos arterioscleróticos confirmam estes dados ²¹⁾.

Como o CF parece fazer parte do complexo multienzimático que é a elastase, nossos achados de valores muito altos em pâncreas de ratos (em relação aos encontrados no tecido adiposo), assim como uma diminuição estatisticamente significativa de CF em glândulas pancreáticas de ratos com arteriosclerose confirmam "in totu" resultados anteriores obtidos com elastase.

O complamin, o 7-[2-hidroxi-3 (2-hidroxi-etil) -metilamino propil]-teofilina, um derivado do ácido nicotínico, que age protegendo animais da arteriosclerose experimental, revelou-se sem ação (em doses de 50 mg) sobre o CF pancreático.

Já o ácido épsilon amino capróico (AEAC) é potente antagonista da heparina e inibidor da elastase ^{(23) (25)}. Daí, talvez, possuir poderosa atividade aterogênica em coelhos ⁽²⁴⁾.

Em doses de 50 — 200 mg de AEAC injetados 24 — 120 horas antes da retirada do pâncreas, a fim de efetuar-se a determinação da atividade do CF, revelou-se o AEAC potente inibidor do CF pancreático. Isto pode ser a possível explicação para sua atividade aterogênica, além de confirmar achados de outros autores, de que inibe a elastase e antagoniza a heparina.

Embora o jejum não altere o CF plasmático ⁽¹⁴⁾, diminui significativamente a atividade desta enzima no tecido adiposo ^{(3) (4)}. Daí, dosarmos a

mesma no pâncreas, verificando uma queda da atividade que atinge a um nadir 48 horas após a retirada de alimentos ($t = 3,3$, $p < 0,05$), e retornando a normalidade 72 — 96 horas após o início do jejum.

Também o achado de valores diminuídos de CF pancreático no pâncreas de ratos com arteriosclerose experimental comprovam achados de outros autores em relação à elastase ^{(8) (18) (19)}.

Estes dados todos provam que a lipase lipoprotéica no pâncreas é uma enzima que deve desempenhar papel importante nesta glândula. Embora estes nossos dados sejam originais, confirmam suposições anteriores de diferentes autores como LANGER e LOEVEN de que o "Clearing Factor" faça parte do complexo elastásico e que tenha papel importante na proteção contra a arteriosclerose.

SUMMARY

"Clearing Factor" Pancreatic.

Pancreatic lipoprotein lipase has been studied in pancreas of normal rat and after submitting these animals to several experiments. The conclusions are the following:

- a) Pancreas is very rich in this enzyme (8 times more than adipose tissue).
- b) Total activation of 48 hours decreases significantly lipoprotein lipase activity of pancreas.
- c) Complamin a, derivative of nicotinic acid (having some activity against experimental atherogenesis), does not affect activity of the pancreatic enzyme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — HAHN, P. F., 1943, "Abolishment of alimentary lipemic following injection of heparin" — *Science* (N. Y.) 98, 19.
- 2 — PÓVOA, JR. H., 1968, "Bioquímica do Clearing Factor" — 1.º Simp. Bioquímica — *Fac. Fil. Ciências e Letras, Univ. Est. Guanabara*, pg. 3.
- 3 — ZEMPLÉNYI, T. 1964, "The lipolytic and esterolytic activity of blood and tissue and problems of atherosclerosis" — *Adv. Lipid Res.* 2, 235.
- 4 — ROBINSON, D. S., 1965, "The Clearing factor lipase activity of adipose tissue" — *Handbook of Physiology* sect. 5, 295.
- 5 — BAKER, S. P., 1956, "A standardized in vitro method of evaluation of clearing factor response in man; its application to an age-wise study" — *Circulation*, 14, 496.
- 6 — BLOCK, W. J., BARKER, N. W. and MANN, F., 1951, "Effect of small doses of heparin in increasing the translucence of plasma during alimentary lipemia. Studies in normal persons and patients having atherosclerosis" — *Circulation*, 4, 674.
- 7 — RODRIGUES, J., PÓVOA JR., H. and PÓVOA L. C., 1967, "Clearing factor in obese patients" — *Acta Biol. Germ.*, 19, 331.
- 8 — PÓVOA JR. H., 1972, "Hiperlipoproteinemias" — *Folha Médica*, 64, 11.
- 9 — FREDRICKSON, D. S., LEVY, R. T., KWITEROVICH, JR., P. O., and JOVER, A., 1969, "The Typing of Hyperlipoproteinemia: a progress report" from "Drugs affecting Lipid Metabolism" — Plenum Press, pg. 307.
- 10 — PÓVOA JR., H. and CALLADO, A. N., 1967, "Dexamethazone and Clearing Factor" — *Acta Physiol. Latino-amer.* 17, 326.
- 11 — DAY, A. J. and PETERS, J. A., 1958, "Observations on clearing factor inhibitor elaborated by cortisone on rabbits" — *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 36, 121.
- 12 — SEIFTER, J. and BAEDER, D., 1954, (Lipemia clearing by Hyaluronidase, Hyaluronate and Desoxycorticosterone and its inhibition by Cortisone, Stress and Nephrosis" — *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N.Y.;) 86, 709.
- 13 — PÓVOA JR., H., CALLADO, A. N. and PEREIRA, J. M. 1968, "Clearing factor em plasma e tecido adiposo de ratos adrenalectomizados" — *Arq. Bras. Endocrin. Metab.* 17, 89.
- 14 — PÓVOA JR., H. and CALLADO, A. N., 1967, "Clearing factor do plasma de ratos após jejum de 7 dias" — *Hospital*, 72, 455.
- 15 — PÓVOA JR., H. and CALLADO, A. N., 1968, "Dexamethazone and the Clearing factor of rat adipose tissue" — *Acta Physiol. latino-amer.* 18, 370.
- 16 — PÓVOA JR., H., CALLADO A. N., PEREIRA, J. M. and COUTINHO, J. M., 1968, "Stress and the clearing Factor of Rat Adipose Tissue" — *Acta Biol. Med. Germ.* — 21, 125.
- 17 — PÓVOA JR., H., 1963, "Enzimas no Sêmen" — *Arq. Bras. Endocr. Metabol.* — 12, 55.
- 18 — LANSING, A. D., 1952, "The Role of Elastic Tissue in the Formation of the Arteriosclerotic Lesion" — *Ann. Int. Med.* — 36, 39.
- 19 — LANGER M., GUIDO, A. and BUTTURINI, N., 1961, "Quadro lipemico ed extratti pancreatici ad attivita elastolitica sul comportamento nelle frazioni colesterolemiche, de fosfore lipidico e del lipidograma a nell aterosclerosi umano e sperimentale from "Drugs Affecting Lipid Metabolism" — edited by Garattini, S. and Padette, R. pg. 538.
- 20 — LOEVEN, W. A., 1967, "Lipolytic activities of a partially purified Enzyme of the Elastase Complex" — *Acta Physiol. Pharmacol. Neerlandica* — 14, 475.
- 21 — LOEVEN, W. A., 1968, "Content of human pancreatic elastoproteinase and elastomucases in relation to age and

- degree of atherosclerosis" — *J. Atheroscl. Res.* — 8, 45.
- 22 — BALKUV, S. and ULUTIN, O., 1971, "Effect of fibrinogen on platelet aggregation" — *Med. Bull. Istanbul* — 1, 287, 1968 apud *Chem. Abstr.* — 74, 96500.
- 23 — LAKIN, K., PYATNITSKII, N. SEIFULLER, R. and EFIMOV, V., 1970, "Antagonist of heparin and heparinoids" — *Geparin* pg 65, 1969 apud *Chem. Abstr.* — 72, 109400.
- 24 — APTEKAR, S. G., METELITSA, V. D., MININA, A. V., ILYUSHINA, D., KASSIL, V., 1970, "Distinctive features characterizing metabolic processes in rabbits kept on a cholesterol free atherogenic diet and following administration of fibrinolytic activity inhibitor" — *Vop. Potan.* — 28, 24, 1969 apud *Chem Abstr.* — 72, 87642.
- 25 — BROWN, J. H. and POLLOCK, S., 1970, "Inhibition of elastase and collagenase by anti-inflammatory drugs" — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, - 135, 792.
- 26 — NAIMI, S., WILGRAM, G. and PRIGER, S., 1965, "Atherogenic and Thrombogenic Diet in the Rats" — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* — 119 541.