

FERNANDA DIAS COSTA

**PERFIL DAS ISOFORMAS DA CREATINA
FOSFOQUINASE EM LESÕES DO TRATO
GASTROINTESTINAL**

*Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação em Farmacologia
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia*

Orientador: Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
- 2000 -**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TV Unicamp
	C823p
V	EX
TOMBO BC	64156
PROC.	16-A-0002005
	C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
TÍTULO	
DATA	10/06/05
Nº CPD	

Bibid: 351776

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C823p Costa, Fernanda Dias
Perfil das isoformas da creatina fosfoquinase em lesões do trato
gastrointestinal / Fernanda Dias Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Isoenzimas. 2. Neoplasia gástricas. 3. Marcadores biológicos.
4. Eletroforese em gel. I. José Pedrazzoli Júnior. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Membros:

1. Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

2. Prof. Dr. Décio Chinzon

3. Profa. Dr. Antonio Frederico M. Magalhães

Handwritten signatures in black ink are present over the list of members. A large signature is written over the first two names, and a smaller signature is written over the third name.

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/04/00

Por todo amor recebido, dedico este trabalho a minha mãe Cecília e aos meus avós José (in memorian) e Luzia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Ao Prof. Dr. José Pedrazolli Júnior, pela amizade e inestimável orientação na conduta deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Heloísa Araújo, Sérgio de Mendonça, em especial, Silvana Calafatti, pelas contribuições críticas, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Maristela Deguer, pela indispensável colaboração na coleta de sangue humano.

Aos amigos da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, em especial, Dra. Christina Eclissato, Rodrigo (Chile), Cristiane, Fabiana, Cláudia, Márcio, Cynthia, Breda, pela amizade, incentivo e pelos muitos momentos de descontração.

Ao meu pai Antonio que mesmo distante, está sempre presente em meu coração.

Aos meus amigos Fábio Bom e Flávia David pelo apoio, paciência e cooperação na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial, Vanderlei pelo apoio e amizade.

À FAPESP, pelo apoio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

“ Não nos tornamos mestres porque sabemos repetir o que os mestres fazem, mas porque aprendemos a pensar por nós mesmos.”

ÍNDICE	PÁG
Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Resumo.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1– Creatina Fosfoquinase ou Creatina Quinase.....	1
1.1.1 – Compartimentação Funcional das isoenzimas da CK.....	2
1.1.2 – Associação Funcional da CK.....	4
1.1.3 – Funções do Sistema CK/PCr.....	5
1.1.4 – Localização de isoenzimas da CK em outros tecidos.....	7
1.2 – Uso da CK como teste diagnóstico.....	9
1.3 – Lesões Orgânicas do Trato Gastrointestinal.....	12
1.3.1 – Esofagite	12
1.3.2 – Gastrite.....	13
1.3.3 – Úlcera Péptica	13
1.3.4 – Neoplasias gastrointestinais.....	14
1.4 – Marcadores tumorais.....	16
1.4.1 – Classificação de marcadores.....	17
2. OBJETIVO.....	20
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	21
3.1 – Pacientes.....	21
3.2 – Critérios de seleção.....	21

3.3 – Determinação dos níveis séricos das isoenzimas de CK.....	22
3.3.1 – Coleta e armazenamento do soro.....	23
3.3.2 – Detecção da atividade da CK.....	23
3.3.3 – Eletroforese em gel de agarose.....	24
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
8. APÊNDICE.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP.....	Adenosina 5'trifosfato
ADP.....	Adenosina 5'difosfato
CK.....	Creatina Fosfoquinase ou Creatina quinase
PCr.....	Creatina fosfato
CK-MM.....	Isoenzima da CK
CK-MB.....	Isoenzima da CK
CK-BB.....	Isoenzima da CK
CK-Mi.....	Isoenzima da CK
CK-Mi (a).....	Isoenzima mitocondrial ubíqua
CK-Mi (b).....	Isoenzima mitocondrial sarcomérica
Pi.....	Fosfato inorgânico
K ⁺	Potássio
SS.....	Sistema Sidney
HCl.....	Ácido clorídrico
H. pylori.....	Helicobacter pylori
TNM.....	Tumor Linfonodo Metástase
PSA.....	Antígeno específico prostático
TGI.....	Trato gastrointestinal
Ph.....	Logaritmo (base 10) do inverso da concentração íon hidrogênio
AST.....	Aspartato aminotransferase
ALT.....	Alanina aminotransferase
γGT.....	γ Glutamil transferase
μL.....	Microlitros
° C.....	Graus Celsius ou centígrados
CEA.....	Antígeno carcinoembriogênico

LISTA DE TABELAS	Pág
Tabela 1 – Distribuição da casuística segundo grupos de interesse	26
Tabela 2 – Distribuição de neoplasias de acordo com os diversos tipos de grupos analisados	26
Tabela 3 – Valores de CK-MM encontrados nos diversos grupos de estudo	26
Tabela 4 – Valores de CK-MM encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas	27
Tabela 5 – Valores de CK mitocondrial encontrados em neoplasias gástricas e colorretais	27
Tabela 6 – Distribuição dos valores de CK-MM U/l encontrados de acordo com a classificação TNM (neoplasias esofágicas e gástricas) e DUKE's (neoplasias colorretais) para os pacientes portadores de neoplasias	27

LISTA DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1 – Valores de CK-MM U/l encontrados nos diversos tipos de indivíduos	28
Figura 2 – Valores de CK-MM U/l encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas	29
Figura 3 – Valores de CK-MiMi U/l encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas	29
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos diversos grupos estudados	30

RESUMO

A determinação das isoenzimas da CK (MM, MB e BB) é de fundamental importância em diagnósticos clínicos de diversas patologias, bem como a determinação da relação entre a razão da CK-MB/CK TOTAL, utilizada como marcador específico para o diagnóstico diferencial de lesão do miocárdio. O objetivo do estudo foi avaliar o perfil eletroforético das isoformas MM, MB e BB como marcador de lesões do trato gastrointestinal. Para tal, avaliamos um grupo de 95 pacientes, de ambos os sexos, com idade média de $44,63 \pm 1,81$ anos, divididos em cinco grupos, dos quais 15 eram normais sendo utilizados como controle, 17 portadores de gastrite, 16 pacientes com úlcera péptica, 16 indivíduos com esofagite péptica, e 31 portadores de neoplasias esofágicas, gástricas ou de cólon/reto. As isoenzimas foram individualizadas e identificadas por eletroforese em gel de agarose.

Nos portadores de gastrite, úlcera ou esofagite não foram observadas diferenças significativas da isoforma MM, quando comparada com o grupo controle. No entanto, em pacientes portadores de neoplasias foi observado um decréscimo de 24% desta isoforma. Em alguns destes pacientes verificou-se uma forma anômala de MM, denominada MiMi (mitocondrial). Uma redução dos níveis séricos de CK-MM pôde ser observada em pacientes portadores de neoplasias gastrointestinais, quando comparados com portadores de outras

enfermidades digestivas ou controles sadios. O potencial diagnóstico desde achado, bem como as suas causas merecem uma investigação detalhada.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – CREATINA FOSFOQUINASE (CK)

O ATP, descoberto em 1929, é uma importante fonte de energia para a maioria dos processos envolvidos em contração muscular (BESSMAN & CARPENTER, 1985). É sintetizado na mitocôndria, podendo ser transportado para o citoplasma pela creatina quinase (CK) (ENJOLRAS & GODINOT, 1997).

O papel da CK foi reconhecido quando se tentava estudar de forma mais detalhada, os processos das reações químicas envolvidos em uma contração muscular (BESSMAN & CARPENTER, 1985).

Na realidade a CK é uma enzima que cataliza a reação de fosforilação reversível entre creatina e ATP, possuindo um papel importante no metabolismo energético de células musculares e cerebrais (ZARGHAMI et al, 1996; FRITZ-WOLF et al, 1996; DE SOUZA et al, 1999). Além disso, essas células requerem energia para o transporte de um grande número de caracteres biológicos ao meio externo (WALLIMANN, 1994)

A CK é um dímero composto de duas subunidades, cada um com massa molecular de aproximadamente 40.000. Estas subunidades (B ou cerebral, M ou muscular) são produtos de genes dos cromossomos 14 e 19, respectivamente (MOSS & HENDERSON, 1999). Por combinação destas subunidades, três isoenzimas foram demonstradas em 1967: CK-MM

(músculo esquelético), a híbrida CK-MB (músculo cardíaco) e CK-BB (tecido cerebral) (CAMAROZANO et al, 1996; ENJOLRAS & GODINOT, 1997). Todas estas três espécies de isoenzima foram encontradas em células, seja em citosol ou associadas à estruturas miofibrilares. (MOSS & HENDERSON, 1999) No entanto, em células com altas demandas energéticas, essas isoenzimas são co-expressas com CK mitocondriais. Estas, como as citosólicas, são codificadas por genes nucleares, mas são importadas para a mitocôndria (WALLIMANN et al, 1992). Esse modelo enzimático, que difere dos demais, é constituído por moléculas diméricas e octaméricas (KALDIS & WALLIMANN, 1995), localizando-se entre a membrana interna e externa da mitocôndria e, por isso, é chamado de CK mitocondrial (BESSMAN & CARPENTER, 1985; BROSNAN, 1993; WALLIMANN, 1994). Essa CK mitocondrial possui uma massa molecular de aproximadamente 80.000 daltons, migra em direção catódica na eletroforese, e foi detectada pela primeira vez em um paciente portador de síndrome de Reye (PRATT et al, 1987). Também possui duas isoformas específicas ao músculo estriado, CK-Mi(b) que é “sarcomérica” e a CK-Mi(a) “úbiqua”, sendo ambas expressas também de maneira tecidual específica, diferindo-se não só pela sequência de aminoácidos, mas também por parâmetros bioquímicos e biofísicos. (WALLIMANN et al, 1992).

1.1.1- COMPARTIMENTAÇÃO FUNCIONAL DAS ISOENZIMAS CK

Em diversos tecidos, as isoenzimas da CK estão compartimentadas

intracelularmente. Nos músculos, o conteúdo de creatina fosfato (PCr) e as proporções enzimáticas da CK encontradas nos diferentes compartimentos subcelulares, dependem de requerimentos fisiológicos (WALLIMANN et al, 1992). Esses compartimentos restringem ou facilitam o acesso de substrato para a enzima, podendo esta ser otimizada pelo pH, por concentrações de íons, cofatores, substratos e localização de precursores enzimáticos. Alguns exemplos de compartimentos são aqueles delimitados por membrana, como: mitocôndria, núcleo e lisossomos (BESSMAN & CARPENTER, 1985).

Uma vez que as isoenzimas da CK estão compartimentadas de maneira intracelular e, uma vez que a reação enzimática trabalha em direções opostas em sítios de produção e consumo energético, é possível que os produtos e substratos dessa reação também estejam compartimentados da mesma forma (WALLIMANN et al, 1992).

No entanto, as isoenzimas da CK são compartimentadas no modelo isoforma-específica, ou seja, as isoformas CK-M e CK-B são citosólicas; e as isoformas, CK-Mi(a) e CK-Mi(b) são especificamente mitocondriais (WALLIMANN & HEMMER, 1994; WALLIMANN, 1994). Entretanto, há casos em que os músculos necessitam contrair-se rapidamente e utilizam a glicólise como principal via de produção para o ATP. Por outro lado, quando refere-se a músculos em contrações mais lentas, o ATP deriva-se da oxidação de ácido graxo na mitocôndria. (WALLIMANN et al, 1992) Tudo isso para se utilizar do circuito da PCr como gerador de ATP, onde este sugere que as isoenzimas citosólicas da CK são localizadas próximas às ATPases e

catalisam o turnover *"in situ"* desse ATP para serem utilizadas.

1.1.2- ASSOCIAÇÃO FUNCIONAL DA CK

Na maioria dos músculos, a capacidade de geração de ATP da CK é muito alta, embora suas concentrações celulares sejam pequenas. Quando ocorre a ativação de alguns tecidos excitáveis, os níveis de ATP envolvido não se modificam significativamente, pois são repostos com eficiência a partir de grandes concentrações de PCr (WALLIMANN et al, 1992).

Assim, todas as contrações ocorridas em músculos, lentas e rápidas são devido a uma associação funcional, ou entre a CK e a glicólise; ou entre a CK e a fosforilação oxidativa. Quando a associação funcional ocorre entre a CK e a glicólise, obtêm-se uma elevação na expressão de CK citosólica e em sua localização com enzimas glicolíticas, que juntamente com concentrações elevadas de creatina fosfato e proporções pequenas de CK mitocondrial levam a uma função de "energia tampão" ao sistema CK/PCr desses músculos. Quando a associação funcional envolvida ocorre entre a CK e a fosforilação oxidativa, esta é expressada em níveis elevados pela CK-Mi. Assim, juntamente com pequenas concentrações de creatina fosfato e níveis baixos de CK citosólico levam o sistema CK/PCr muscular a uma função de "transporte de energia" (WALLIMANN et al, 1992).

1.1.3- FUNÇÕES DO SISTEMA CK/PCr

Na verdade o conceito funcional para a CK, o modelo “circuito creatina fosfato” baseia-se no conceito de múltiplas funções desempenhadas pelo sistema CK/PCr. Uma primeira e principal função desse sistema é a de tampão de energia temporal, onde tanto a creatina fosfato ou somente a creatina, fornecem modelos paralelos difusivos para o ATP e ADP através de associações funcionais das isoenzimas de CK, sendo isto obtido por glicólise, fosforilação oxidativa ou processos que envolvam o consumo de ATP. Na sequência, a função é de tampão de energia espacial ou sistema de transporte de energia, onde serviria o circuito como carregador de energia. Outra importante função do sistema é prevenir uma elevação na ADP livre intracelular, evitando assim, inativação de ATPases celulares e perda de nucleotídeos de adenina. Na sequência, outra função é a de tamponamento de próton, uma vez que a reação da CK em direção a regeneração do ATP não utiliza somente ADP, como também prótons, sendo ambos produtos de hidrólise de ATP (WALLIMANN et al, 1992). Além disso, a liberação de fosfato inorgânico (Pi) também é outra função do sistema CK/PCr onde durante as primeiras fases do trabalho muscular, o Pi aumenta proporcionalmente com a hidrólise de PCr (WALLIMANN & HEMMER, 1994). Finalmente, como última função do sistema temos o fornecimento de razões ATP/ADP locais em sítios intracelulares. Todavia, ao se manter essa razão alta na proximidade de uma ATPase, a eficiência termodinâmica de hidrólise de ATP se eleva pela CK (WALLIMANN et al, 1992).

A estrutura funcional da CK também têm sido analisada através de dois aspectos onde o primeiro, demonstra a PCr servindo como via de ATP celular e concentrações de ADP em reação com a CK e o segundo demonstra que o transporte de fosfatos de energia elevada é predominantemente na forma química de PCr, sendo que sua função no transporte energético na reação CK pode ser compreendida e quantitativamente tratada como um caso especial de difusão facilitada (MEYER et al, 1984).

Existem três principais funções celulares que requerem ATP para o sistema creatina fosfato: contração, síntese macromolecular e conservação de gradiente iônico. Há relatos que demonstram uma atividade inferior de miosina atpase quando em presença de CK, onde sugere-se uma interação entre ambas. Já a CK-MM miofibrilar em sua cinética contrastando com a CK mitocondrial, demonstra que suas concentrações de substratos normalmente encontradas nas células favorecem a síntese de ATP pela PCr e ADP. Em outros casos, a CK foi associada a fragmentos de retículo sarcoplasmático fornecendo energia para o transporte de cálcio, sugerindo isso uma associação funcional entre ATP dependente, transporte de cálcio e CK (BESSMAN & CARPENTER, 1985).

1.1.4- LOCALIZAÇÕES DE ISOENZIMAS CK EM OUTROS TECIDOS

Todas as isoenzimas de CK analisadas não foram somente observadas em músculos esquelético, cardíaco ou em cérebro mas também em outros tecidos, como por exemplo, no espermatozoa, células fotorreceptoras da retina, células epiteliais intestinais e rim (WALLIMANN et al, 1992; WALLIMANN & HEMMER, 1994; WALLIMANN, 1994). Contudo, em determinadas propriedades cinéticas entre isoenzimas da CK, quando em dois diferentes tecidos, não foi demonstrada uma diferença significativa (SCHNEIDER et al, 1988).

Baseado em estudos, foram identificadas duas isoformas de CK no espermatozoa humano e da espécie galinácea, a CK-BB (cerebral) e a CK-Mi mitocondrial (WALLIMANN & HEMMER, 1994). Estando ambas segregadas, a isoforma BB foi encontrada no flagelo do espermatozóide, enquanto a CK-Mi confinava-se na porção média das mitocôndrias. Entretanto, também foram encontradas grande atividade de CK, dentre as quais encaixam-se a isoenzima CK-BB e CK-Mi, em retina de frango e bovino, em várias camadas e tipos celulares, onde uma maior parte concentra-se na camada celular fotorreceptora (WALLIMANN et al, 1992; WALLIMANN & HEMMER, 1994). Além disso, células gliais de Müller contém também apreciáveis quantidades de CK-BB, indicando assim, que elas possuem estado de alta energia e o sistema CK/PCr pode estar envolvido na reabsorção de K^+ e de outras funções relacionadas a ATP dependentes (WALLIMANN et al, 1992).

A CK foi considerada como de grande importância para tecidos endócrinos. O fato de que a PCr e a atividade da CK foram identificadas no pâncreas, com a CK-BB sendo a isoenzima de maior concentração, mostrou que ambas poderiam desempenhar sua função na secreção de insulina e/ou glucagon (WALLIMANN & HEMMER, 1994).

Em se tratando da CK cerebral, esta serve como chave metabólica desse tecido. A glicólise aeróbica é a via primária da síntese de ATP no cérebro, com baixas reservas de glicose, glicogênio e oxigênio associadas ao fluxo sanguíneo cerebral. Para essa associação utiliza-se de ATP por fatores como: pH local, [ADP], [K⁺] extracelular, sendo que uma fonte importante na síntese desse ATP é o sistema CK/PCr (WALLIMANN et al, 1992). A isoenzima mais presente no cérebro é a CK-BB citosólica, tendo sido caracterizada extensivamente com considerável heterogeneidade em frangos, possuindo 2 maiores subunidades tipo B e subespécies adicionais surgindo para uma iniciação ribossomal alternativa e modificações pós-traducionais (WALLIMANN & HEMMER, 1994; WALLIMANN et al, 1992). A atividade da CK cerebral também foi associada com a mitocôndria, sendo identificada autenticamente como a CK-Mi cerebral. Além disso, a CK-Mi ubíqua (a) foi localizada nas frações de sítio de contato da membrana na mitocôndria cerebral. Portanto, pode-se dizer, que as principais enzimas nos tecidos cerebral e neural são a CK-Mi(a) e CK-BB, não esquecendo de considerar a CK-MM mesmo em quantidades menores.

Na realidade, estudos sobre a utilização da CK tentam abordar detalhadamente sua caracterização funcional e de isolamento de

microcompartimentos adicionais de CK/ATPase de diversos tecidos, utilizando-se de métodos imunohistoquímicos e bioquímicos. (WALLIMANN et al, 1992).

1.2- USO DA CK COMO TESTE DIAGNÓSTICO

Em diversos tipos de lesões gastrointestinais, estão sendo feitas algumas análises detalhadas, visando diagnóstico precoce da enfermidade (LAETHEM, 1995).

Concentrações elevadas de creatina fosfoquinase poderiam surgir em células com atividade elevada (por exemplo neoplasias), bem como em situações com lesão de órgãos ricos na mesma (TSUNG, 1983; ZARGHAMI et al, 1996).

Ocasionalmente, isoenzimas com variações para CK-MM podem ser encontradas e são designadas CK atípicas ou macro-CK (TSUNG, 1986). Têm-se investigado a macro CK como um marcador neoplásico, principalmente para carcinoma de pequenas células do pulmão (MCging et al, 1990; LEE et al, 1985).

No caso da CK mitocondrial, além de ser indicativa no aumento de mortalidade, sua presença está associada com doenças severas, cirrose ou malignidade, e desde então, sua utilização é sugerida como marcador tumoral (OKANO et al, 1987; PRATT et al, 1987).

A utilidade da CK-MB para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio tem sido suficientemente documentada (LEE E GOLDMAN, 1986), através

de ensaios técnicos com elevada especificidade (LEE et al, 1985). Sua atividade também tem sido observada, após cirurgia gastrointestinal (TSUNG, 1982). A necrose das células miocárdicas leva a uma liberação da CK intracelular e pode ser medida no sangue periférico por um período de quatro a oito horas após o infarto. Processo semelhante pode acontecer nas situações de isquemia ou infarto do trato gastrointestinal, já que a ocorrência das isoformas da CK foram descritas tanto na mucosa como na musculatura do trato gastrointestinal, sendo que o percentual de CK na musculatura foi bem superior ao da mucosa (GRAEBER et al, 1984). Os sinais e sintomas clínicos de infarto intestinal são inespecíficos, dificultando, desta forma, o seu diagnóstico (MATTOX E GUINN, 1973; KWAAN & CONNOLLY, 1983). No momento do aparecimento dos sinais de peritonite, acidose e choque, o processo está significativamente avançado e o prognóstico é pobre (OTTINGER, 1982). Tem sido relatado que pacientes diagnosticados com infarto de intestino representaram 0,2% das admissões e 2% dos óbitos do serviço médico de uma instituição hospitalar (COOKE E SANDE, 1983). Modelos experimentais de infarto intestinal em animais mostraram um significativo aumento de CK total e suas isoformas (GRAEBER et al, 1981a e 1981b).

Indivíduos normais apresentam no soro quase exclusivamente a forma MM, com traços de MB e BB. Uma variedade de situações clínicas com degeneração ou trauma muscular elevam os níveis de CK-MM (COOLEN et al, 1979).

Em se tratando de CK-BB, mesmo esta estando presente em tecidos

humanos, como o sistema nervoso central, o trato gastrointestinal, ela é rapidamente eliminada e/ou inativada, quando comparada com outras isoenzimas da CK (SCHWARTZ et al, 1989).

No entanto, sua elevação foi constatada em indivíduos portadores de osteopetrose autossomal dominante tipo II (YONEYAMA et al, 1992). Havendo, embora, uma elevação em neoplasias em células ósseas gigantes, sendo sugerida como marcador para esta enfermidade (FUKUDA et al, 1994).

Casos isolados de aumento de CK-BB em pacientes com infarto intestinal já foram relatados (LAMAR et al, 1978; DORAN, 1979; FRIED et al, 1991).

Experimentalmente, elevação de CK-BB também foi encontrada em casos de dano hepático causado por isquemia seguida de reperfusão em ratos (VAUBOURDOLLE et al 1993), e em casos com metástases malignas, especialmente carcinoma de próstata e carcinoma de pequenas células do pulmão (KURTZ et al, 1985; Mcging et al, 1990).

Além de apresentar-se elevada em casos de necrose isquêmica de tecidos do trato gastrointestinal, elevações da CK-BB têm sido descrita em casos de neoplasias de pulmão, estômago e intestino (COOLEN et al, 1979; HIRATA et al, 1989; LEDERER & GERSTBREIN, 1993; NIKLINSKI et al, 1991; TSUNG, 1982; TSUNG, 1983; HOAG et al, 1978), como também em neoplasia de próstata e mama. (WONG et al, 1987).

Muito embora as elevações de CK e suas isoformas sejam utilizadas em alguns casos, sua possível utilização como marcador sorológico de

diversas enfermidades, seu papel no diagnóstico de neoplasias gastrointestinais ou mesmo de outras lesões do trato digestivo, em que ocorrem destruição ou proliferação tecidual, como esofagite ou úlceras pépticas, poliposes, retocolite ulcerativa ou doença de Crohn, não é amplamente conhecida.

1.3 - LESÕES ORGÂNICAS DO TRATO GASTROINTESTINAL

1.3.1.- ESOFAGITE

O conceito de esofagite péptica datado de 1935, sugeria que a secreção gástrica era a principal causadora de danos à mucosa nela observada. Somente em 1946 é que foi introduzido o termo esofagite de refluxo (KAHRILAS, 1998).

A esofagite pode ter sua classificação baseada em Savary Miller, onde a esofagite é dividida em 5 graus.

Grau I – Erosões lineares não confluentes.

Grau II – Erosões longitudinais, confluentes não circunferenciais.

Grau III – Erosões longitudinais, confluentes circunferenciais, que sangram com facilidade.

Grau IV a – Uma ou mais ulcerações esofágicas, em zona de transição da mucosa, podendo estar associadas a uma estenose ou metaplasia.

Grau IV b – Estenose sem evidências de erosões ou úlceras. (TOLENTINO et al, 1996/1998).

1.3.2- GASTRITE

O termo gastrite, têm sido utilizado para descrever uma diversidade de alterações, heterogêneas, macro e microscópicas da mucosa gástrica, usualmente associada a uma resposta inflamatória aguda, crônica ou mista. Atualmente, utiliza-se uma classificação denominada Sistema Sydney (SS) que consiste em duas classificações interligadas: a histológica que refere-se a uma divisão histológica; e a endoscópica que refere-se a uma divisão endoscópica (CASTRO ET AL, 1993).

1.3.3- ÚLCERA PÉPTICA

A úlcera péptica é uma doença de evolução em geral crônica, tendo sua localização em porções do tubo digestivo estando em contato direto com a secreção de ácido clorídrico (HCl). Deve ser diferenciada da úlcera aguda e da erosão por diversos fatores clínicos e histológicos. Caracteriza-se por uma perda de tecido, que pode ou não estender-se à *muscularis mucosae* (CASTRO et al, 1993; MINCIS, 1979; SOLL, 1998).

De um modo geral, as úlceras são classificadas por vários métodos, dentre um deles, o método de Sakita, onde as lesões ulceradas se agrupam de acordo com o estágio da atividade. Esses estágios são divididos em três sendo cada um deles subdividido em dois.

O primeiro é o estágio A - são as úlceras ativas que subdividem-se em A1, onde a ulceração é medianamente profunda, com haio de edema e

pregas convergentes com extremidades abauladas; e A2, onde a ulceração mesmo também sendo profunda suas pregas se convergem para a borda com suas extremidades afiladas.

O segundo é o estágio H - onde as úlceras estão em cicatrização. Subdividem-se em: H1, com ulcerações rasas, hiperemia de borda, sendo que as pregas convergentes podem estar ausentes; H2, a lesão é superficial semelhante a uma erosão, sem hiperemia circunjacente.

O terceiro e último estágio S - onde as úlceras já estão cicatrizadas. Dividem-se em S1, quando não se observa uma continuidade da mucosa, mas a coloração desta é ainda avermelhada; e S2 demonstra uma cicatrização completa, onde o local da lesão possui uma coloração branca (ZATERKA ET AL, 1998).

1.3.4- NEOPLASIAS GASTROINTESTINAIS

Neoplasia poderia ser definida como um rompimento que ocorre no mecanismo normal de um ciclo celular (RUSTGI & PODOLSKY, 1998).

A neoplasia de esôfago é uma das neoplasias com mais elevada taxa de mortalidade. Ocorre, na maioria das vezes em decorrência de deficiência vitamínica, consumo excessivo de álcool, tabagismo e outros (AXELRAD & FLEISCHER, 1998). Seu tipo histológico em 90% dos casos, carcinoma espinocelular (FORONES et al, 1997).

A neoplasia gástrica em algumas pesquisas epidemiológicas feitas, é sugerida como um tipo neoplásico que ocorre em classes de níveis

sócioeconômico mais baixos (MAYER, 1998). O seu tipo histológico é em 98% dos casos, adenocarcinoma (POSSIK & MINCIS, 1997).

Tanto em neoplasia de esôfago como em neoplasia gástrica, a forma de estadiamento mais utilizada é feita através da classificação de TNM da União Internacional de Combate ao Câncer. Essa classificação baseia-se: em T, na profundidade da extensão da invasão da neoplasia, em N, avalia a invasão não somente de linfonodos mediastinais mas também dos perigástricos, com exclusão dos celíacos, e finalmente em M, avalia-se a presença ou ausência de metástase à distância (MALAFAIA, 1993).

A neoplasia colorretal vem aumentando significativamente nos últimos anos, sendo a segunda causa de morte nos EUA. Estudos epidemiológicos demonstram uma correlação direta entre mortalidade por neoplasia colorretal e consumo de calorias a base de proteínas da carne vermelha e alimentos gordurosos (MAYER, 1998). Entretanto, em pacientes portadores de neoplasias colorretais o prognóstico possui uma adequada relação com a profundidade da penetração neoplásica na parede intestinal, com a existência de comprometimento de linfonodos regionais e metástase à distância. Além disso, todos esses parâmetros estão incorporados ao sistema de estadiamento elaborado por DUKE'S sendo recentemente aplicado ao método de TNM, ou seja, pacientes portadores de lesões superficiais e que essa lesão não tenha penetrado na camada muscular ou comprometido linfonodos regionais são considerados como portadores da doença em estágio A; aqueles dos quais a neoplasia penetrou mais profundamente sem atingir linfonodos têm doença em estágio B; já o

comprometimento dos linfonodos regionais definem o estágio C e a disseminação metastática indica o estágio D (HABR-GAMA et al, 1993; MAYER, 1998).

1.4- MARCADORES TUMORAIS

Algumas neoplasias podem ser caracterizadas ou monitoradas pela presença ou produção de certos marcadores, como antígenos, proteínas ou hormônios (SMITH et al,1976; VAITUKAITUS, 1976; KAHN et al, 1976; ROSEN et al, 1975), assim como de elevações ocorridas em diversas atividades, como no caso da síntese de óxido nítrico (FUJIMOTO et al, 1997).

Marcadores tumorais são substâncias indicativas de um desenvolvimento tumoral, sintetizadas pelo próprio tumor, que são liberadas para a circulação sistêmica ou produzidas por tecidos normais em resposta a uma invasão ocorrida por parte dessas células neoplásicas. Algumas dessas substâncias podem se expressarem em células neoplásicas de vários órgãos, mas nem todas as células de uma única neoplasia expressam uma determinada substância (MANOUKIAN, 1990). Esses marcadores, têm por finalidade o diagnóstico e a localização do tumor, rastreamento populacional, determinação do prognóstico facilitando a monitorização terapêutica(CHAN & SELL, 1999; OSHIMA et al,1998). Podem ser medidos qualitativamente ou quantitativamente por técnicas imunológicas (bioquímicas ou imunohistoquímicas). No entanto, eles não são completamente específicos,

podendo ser detectado em tecidos ou sangue de pacientes com patologias benignas ou até mesmo em indivíduos normais (FERRIGNO et al, 1995).

1.4.1- CLASSIFICAÇÃO DE MARCADORES

Os marcadores tumorais são classificados através dos seguintes grupos: enzimas, hormônios, receptores, proteínas séricas e genéticos (WARD & COCKAYNE, 1993).

As enzimas estão presentes em altas concentrações dentro da célula e são lançadas na circulação sistêmica como resultado de necrose tumoral ou pela mudança na permeabilidade da membrana celular (CHAN & SELL, 1999). Sua elevação nunca é específica para uma determinada neoplasia (WARD & COCKAYNE, 1993) tornando-se assim, satisfatória como marcador não específico, uma vez que essa elevação em sua concentração somente possibilita verificar se há presença de malignidade. Sua localização intracelular, pode determinar a taxa do lançamento e até que elas sejam lançadas, a metástase do tumor pode ter acontecido (CHAN & SELL, 1999). Como exemplo têm-se o aumento da atividade de lactato desidrogenase em soro usualmente associado a doenças malignas. Contudo esse modelo de isoenzima pode refletir um órgão afetado por malignidade, mas muitos desses aumentos não são específicos (Ng et al, 1987). Já a enolase neuro-específica é um potente marcador para a organização e monitoração da resposta do cancer pulmonar, só que em pequenas células (LIIPPO et al,

1991).

Algumas neoplasias endócrinas também são secretoras de hormônios (CHAN & SELL, 1999).

Os antígenos oncofetais, são proteínas produzidas durante a vida fetal estando presentes em concentrações elevadas no soro de fetos diminuindo muito seus níveis ou desaparecendo após o nascimento (FERRIGNO et al, 1995; CHAN & SELL, 1999). Um dos principais marcadores utilizados dentro desse grupo, principalmente em diagnóstico clínico de neoplasias do trato digestivo, é o CEA (Antígeno Carcinoembriogênico), que durante 1965 foi utilizado no acompanhamento de neoplasia colorretal, sendo ainda o melhor a ser utilizado como prognóstico (OSHIMA et al, 1998; CHAN & SELL, 1999).

Os carboidratos relacionados aos marcadores tumorais ou são antígenos na superfície da célula tumoral ou são secretados por essas células. Representam mucinas de alto peso molecular ou antígenos de grupo sanguíneo (CHAN & SELL, 1999). O CA 19-9, é um exemplo de glicoproteína do tipo mucina sintetizada por células do pâncreas, do epitélio do estômago e cólon, usado principalmente em diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de neoplasias de pâncreas, elevando-se em 80% nesses pacientes. Sua especificidade é de 75%, onde um diagnóstico diferencial entre neoplasia de pâncreas e pancreatite crônica torna-se dificultada mesmo com auxílio de marcadores (OSHIMA et al, 1998). Já o CA 50 é um recente marcador detectado por anticorpos monoclonais, que reconhece o antígeno CA 19-9 tendo, por esse motivo, uma sensibilidade semelhante (MANOUKIAN, 1990), foi desenvolvido para

evolução de diversas malignidades, especialmente neoplasia gastrointestinal. Apesar de não específico, os níveis de CA 50 são aumentados em aproximadamente 50 – 80% em pacientes portadores de neoplasias colorretais, gástricas, pancreáticas, hepatobiliares e esofágicas. Isso o torna muito útil se combinado com outros marcadores tumorais. Sua combinação com outros marcadores previamente definidos pode adicionar informações sobre o prognóstico de alguns pacientes portadores de neoplasias colorretais, biliares ou gástricas (BUNWORASATE et al, 1995).

Dentre outros marcadores incluem-se os genéticos (oncogêneses e os genes supressores). Esses dois últimos estão relacionados à mudanças genéticas ocorridas pelo crescimento neoplásico, que é uma importante característica de excitabilidade celular (CHAN & SELL, 1999). Essas alterações genéticas múltiplas têm sido associadas a tumores colorretais, sendo confirmadas, somente, quando adquiridas em fase inicial do desenvolvimento tumoral (OLSCHWANG et al, 1998). Com relação aos níveis de fibronectina, estes podem ser indicativos de neoplasias ou outras condições clínicas, em plasma e fluidos corporais (YLATUPA et al, 1995).

2.OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi o de avaliar o perfil eletroforético das isoenzimas da creatina quinase MM, MB e BB como marcador de lesões do trato gastrointestinal.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1- Pacientes

Entre o período compreendido de 1998 a 1999 foram avaliados 95 indivíduos submetidos a endoscopia digestiva alta ou baixa na Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia Clínica da USF (UNIFAG).

3.2- Critérios de Seleção

Foram incluídos neste estudo prospectivo, indivíduos portadores ou não de patologias , sendo divididos em grupos controles sadios, selecionados entre os pacientes do ambulatório de gastroenterologia que necessitaram de endoscopia digestiva. Os controles não apresentaram sinais ou sintomas evidentes de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal (exceto inflamação antral, causada por *H. pylori*, ou colopatia funcional), hematológica ou psiquiátrica, com base na história clínica, nos exames físico e psiquiátrico, endoscopia digestiva (alta e/ou baixa), e nos seguintes exames laboratoriais: glicemia, uréia, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina, γ GT, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina e protoparasitológico. Além disso, não apresentavam quadro clínico sugestivo ou

antecedentes de neoplasia, não pertenciam a grupos de risco para neoplasias de trato gastrointestinal, e não foram submetidos a cirurgias abdominais ou torácicas anteriores, totalizando 15 indivíduos.

Portadores de gastrite antral, diagnosticados por meio de endoscopia e portadores de *H. pylori*, com diagnóstico feito por meio de teste de urease rápido e pesquisa histológica com coloração hematoxilina eosina e Giemsa, totalizando 17 indivíduos.

Indivíduos que apresentaram esofagite péptica, classificados de acordo com Savary Miller, totalizando 16.

Grupos de indivíduos portadores de úlcera péptica A1, A2 ou H1, classificados de acordo com Sakita, totalizando 16 .

Finalmente, indivíduos portadores de neoplasias do trato gastrointestinal, classificados de acordo com a enfermidade de base em neoplasias de cólon/reto, esofágicas e gástricas, e estadiados de acordo com a classificação TNM (neoplasias de esôfago e estômago) ou DUKE'S para neoplasias de cólon/reto, totalizando 31.

Foram excluídos do estudo, indivíduos com antecedentes cirúrgicos gastrointestinais.

Todos os participantes assinaram termo de consentimento esclarecido e o protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa -USF.

3.3- Determinação dos níveis séricos das isoformas da CK

3.3.1- Coleta e Armazenamento do soro

A coleta de material foi feita através de uma punção venosa, com retirada de 5 ml de sangue, em tubo seco (sem anticoagulante). Após a coagulação, o material foi centrifugado a 800 g por 10 min, e o soro, utilizado para as determinações. A concentração da CK total foi determinada por meio de procedimento automatizado (Cobas Mira Plus, Roche, CK UNIMATE Roche, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, S. Paulo, Brasil).

3.3.2- Detecção da Atividade da CK

A determinação das isoformas de CK foi feita por meio de eletroforese em agarose, conforme (GORUS et al, 1988; VAUBOURDOLLE et al, 1993), utilizando-se o Kit CPK AGARO STAIN (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA). A concentração relativa de cada fração foi avaliada por densitometria do gel, utilizando-se o programa para computador SIGMAGEL (Jandel Software, San Raphael, CA, USA).

Os resultados foram avaliados quanto a significância pelo teste de Mann-Whitney. Um $p < 0,05$ foi utilizado para determinar a diferença significativa entre os resultados obtidos.

3.3.3- Eletroforese em gel de agarose

De cada amostra coletada foi colocado de três a quatro μl em cada sítio do gel de agarose, sendo feito entre etapas de aproximadamente um minuto cada uma, para completa absorção da amostra. Depois o gel foi montado na cuba, para respectiva corrida eletroforética por um tempo de 30 minutos.

Após esses 30 minutos, o gel foi embebido em solução corante a 37°C protegido de luz, por mais 30 minutos. Sendo então, lavado mais 30 minutos em solução de ácido acético com metanol e depois entre 15 a 30 minutos em água destilada.

Finalmente, o gel é submetido a secagem sob ar quente e armazenado a uma temperatura ambiente protegido da luz.

4. RESULTADOS

A distribuição dos participantes nos diversos grupos de estudo está apresentada nas tabelas 1 e 2. Tanto indivíduos normais (controles sadios) bem como os portadores de lesões benignas do trato digestivo, apresentaram apenas a banda MM na eletroforese (Figura 4).

Indivíduos portadores de diferentes tipos de neoplasias como: esofágicas (38,23 U/l \pm 13,46), gástricas (7,90 U/l \pm 3,89) e colorretais (11,76 U/l \pm 4,75), apresentaram uma redução significativa nos níveis séricos de CK-MM, quando comparados aos demais grupos avaliados (Tabelas 3, Figura 1). Portadores de adenocarcinoma apresentaram uma maior redução dos níveis sangüíneos de CK-MM do que portadores de carcinoma epidermóide (Tabela 4, Figura 2), sendo que esta redução não se correlacionou com o estadiamento da neoplasia (Tabela 6).

Apenas um paciente, portador de neoplasia de esôfago apresentou banda de fração BB à eletroforese. Oito pacientes portadores de neoplasias (quatro gástricas e quatro colorretais) apresentaram uma banda anômala, descrita como sendo CK MiMi (figura 1;4 e tabela 5), sendo que seis destes apresentavam neoplasia metastática e dois neoplasia sem metástases detectáveis clinicamente.

Tabela 1.: Distribuição da casuística segundo grupos de interesse.

Grupos de Estudo	N
Neoplasia	31
Normal	15
Esofagite	16
Gastrite	17
Úlcera	16

Tabela 2.: Distribuição de neoplasias de acordo com os diversos tipos de grupos analisados.

TOTAL DE NEOPLASIAS	31
NEOPLASIA DE CÓLON/RETO	13
NEOPLASIA DE ESÔFAGO	7
NEOPLASIA GÁSTRICA	11

Tabela 3.: Valores de CK-MM encontrados nos diversos grupos de estudo.

	CK – MM U/l (média ± EPM)	p
Neoplasia (n = 23)	18,64 ± 5,22	
Normal (n = 15)	61,56 ± 11,43	0,005 #
Esofagite (n = 16)	88,83 ± 20,72	0,001 #
Gastrite (n = 17)	55,47 ± 13,06	0,05 #
Úlcera (n = 16)	82,57 ± 17,21	0,005 #

em relação a portadores de neoplasias

Tabela 4: Valores de CK-MM encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas.

NEOPLASIA	CK-MM U/l (média ± EPM)	p
Esofágica (n = 7)	38,23 ± 13,46	#
Gástrica (n = 7)	7,90 ± 3,89	#
Colorretal (n = 9)	11,76 ± 4,75	#

Não significante

Tabela 5.: Valores de CK mitocondrial encontrados em neoplasias gástricas e colorretais.

Neoplasia	CK-MiMi U/l (média ± EPM)	p
Gástrica (n = 4)	33,09 ± 16,74	#
Cólon/reto (n = 4)	21,55 ± 11,38	#

Não significante

Tabela 6.: Distribuição dos valores de CK-MM U/l encontrados de acordo com a classificação TNM (neoplasias esofágicas e gástricas) e DUKE'S (neoplasias de cólons e reto) para os pacientes portadores de neoplasia.

NEOPLASIA	CK-MM U/l (MÉDIA ± EPM)					
	TNM			DUKE'S		
	IA	III	IV	A	B	C
ESOFÁGICA (n=7)		43,77±21,01 (n=3)	34,08±20,02 (n=4)			
GÁSTRICA (n=7)	8,63 (n=1)		7,78±4,60 (n=6)			
COLORRETAL (n=9)				7,73 (n=1)	14,85±6,92 (n=6)	4,51±1,98 (n=2)

Figura 1.: Valores de CK-MM U/l encontrados nos diversos tipos de pacientes.

* $p < 0,05$ comparado com os demais grupos

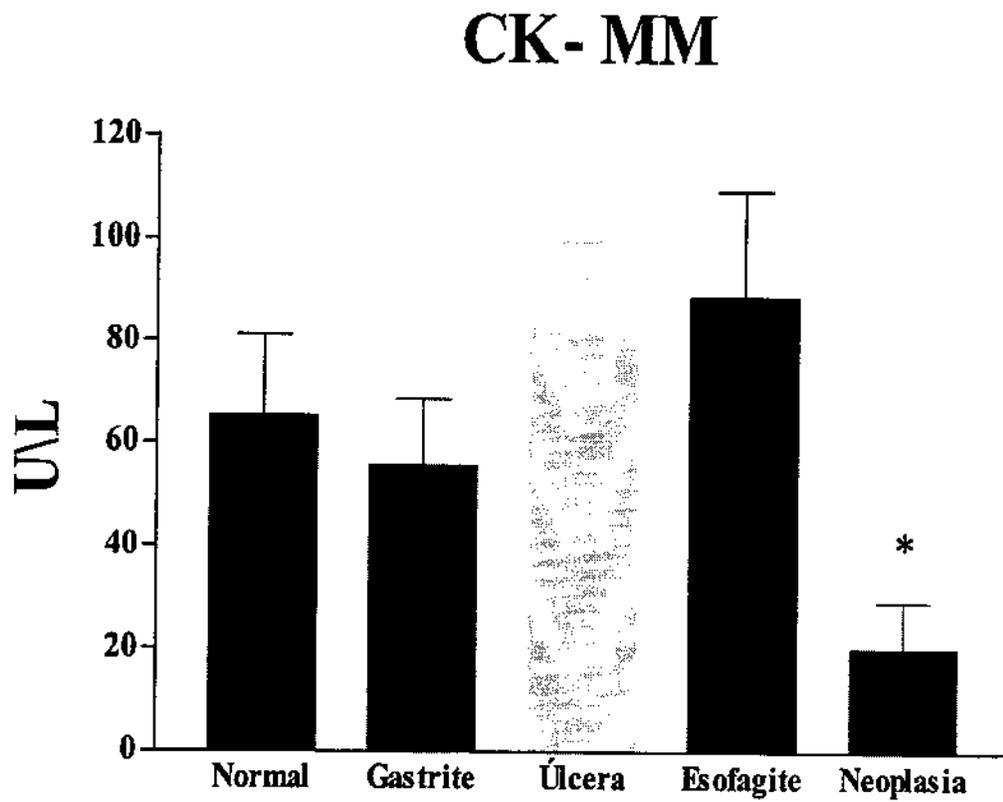


Figura 2.: Valores de CK-MM U/l encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas. onde:

* $p < 0,005$ comparado com o grupo controle

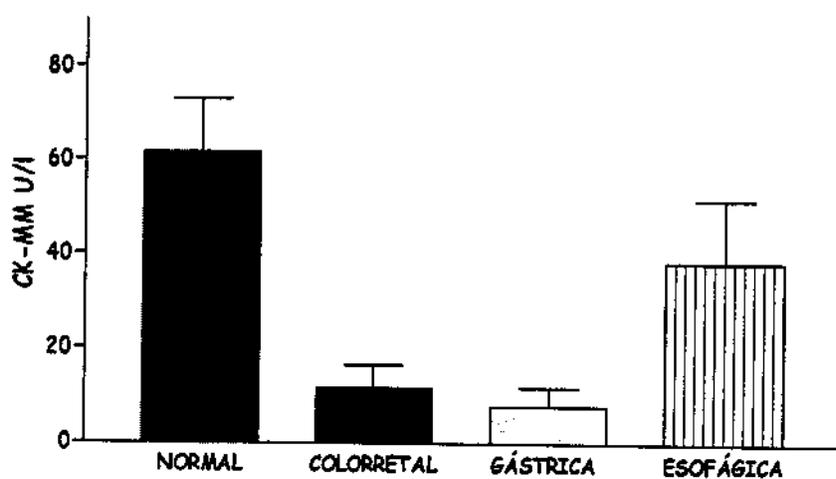
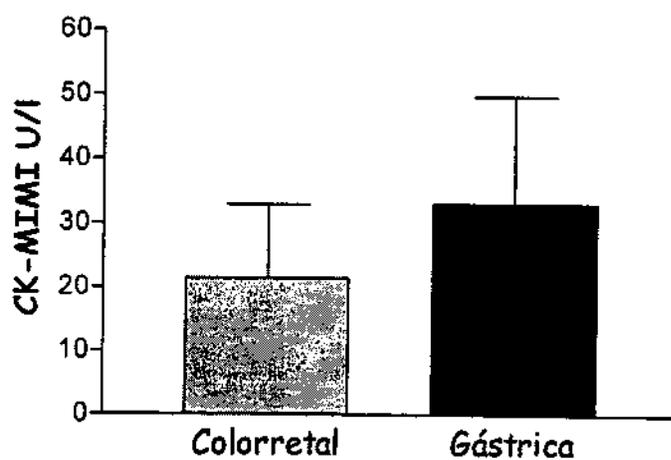


Figura 3.: Valores de CK-MiMi U/l encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas.



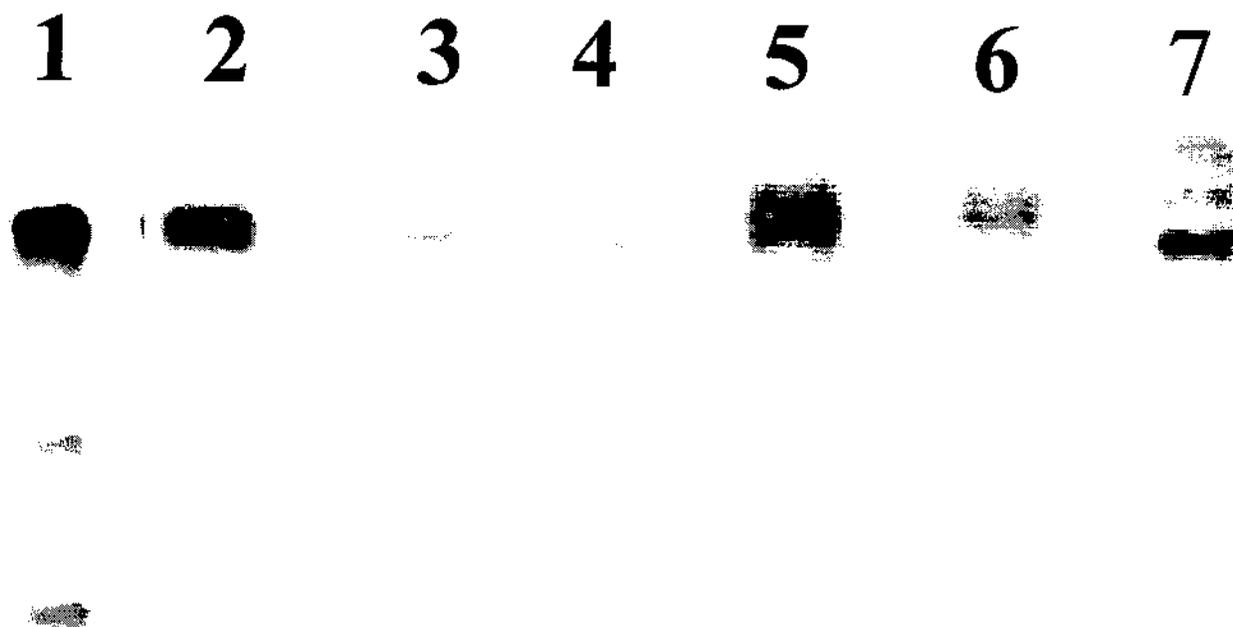


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose para detecção das isoformas da enzima CK em diferentes tipos de patologias gastrointestinais. A linha um representa amostra padrão CK isotrol. A linha dois representa amostra de soro em paciente portador de úlcera péptica. A linha três representa amostra de soro de paciente normal. A linha quatro representa amostra de paciente portador de neoplasia gástrica. A linha cinco representa amostra de soro de paciente com esofagite. A linha seis representa amostra de soro de paciente com diagnóstico de gastrite. A linha sete representa amostra de paciente portador de neoplasia de cólon, tendo visualização da forma anômala MiMi. Estes resultados são representativos de diversos experimentos individuais.

5. DISCUSSÃO

A caracterização de células malignas ou alteradas tem levado a tentativas de identificação de marcadores que pudessem ser úteis na identificação precoce de neoplasias gastrointestinais.

Assim, os métodos mais utilizados baseiam-se na antigenicidade de constituintes da superfície celular. O primeiro destes marcadores a ser utilizado, com base neste princípio, é o antígeno carcino embriogênico (CEA), que é uma proteína encontrada durante a vida fetal, presente apenas em baixas concentrações durante a vida adulta. Em pacientes portadores de malignidades, sua concentração pode elevar-se. No entanto, uma elevação em seus níveis, têm sido constatada em portadores de neoplasias de pequenas células do pulmão (FERRIGNO & BUCCHERI, 1995).

A avaliação clínica da utilidade deste marcador em pacientes com neoplasia colorretal durante 25 anos tem demonstrado seu valor, mas também suas limitações, como a possibilidade de elevação de seus níveis em enfermidades com nível de multiplicação celular e inflamação (RUSTGI & PODOLSKY, 1998).

Um outro importante marcador utilizado em neoplasias gastrointestinais é o CA 50 detectado por anticorpos monoclonais, que reconhece o antígeno CA 19-9 tendo, por esse motivo, uma sensibilidade semelhante (MANOUKIAN, 1990), foi desenvolvido para evolução de diversas malignidades. Apesar de não específico, os níveis de CA 50 são aumentados

em aproximadamente 50 – 80% em pacientes portadores de neoplasias colorretais, gástricas, pancreáticas, hepatobiliares e esofágicas. Isso o torna muito útil se combinado com outros marcadores tumorais. Sua combinação com outros marcadores previamente definidos pode adicionar informações sobre o prognóstico de alguns pacientes portadores de neoplasias colorretais, biliares ou gástricas (BUNWORSATE et al, 1995).

Por outro lado, quando falamos de marcadores enzimáticos, alguns desses modelos podem estar presentes em altas concentrações dentro da célula, mas não possuem uma elevação tão específica, em seus níveis séricos, para uma determinada neoplasia (WARD & COCKAYNE, 1993). É o caso, por exemplo, da atividade da lactato desidrogenase, onde elevações em seus níveis podem descrever um órgão afetado por alguma malignidade, não possuindo muita especificidade (Ng et al, 1987).

Todavia, elevações de CK-BB em soro, também estão tendo grandes considerações como marcadores em desenvolvimento, sendo utilizados para monitoração de estadios patogênicos em doenças neoplásicas (BEREZNITSKY, 1982). Como é o caso sugerido por Kurtz & Nielsen que descreveram uma elevação dos níveis de CK-BB em pacientes portadores de adenocarcinoma pulmonar, principalmente quando em estadio avançado. Assim, essa elevação poderia ser, não somente utilizada como um marcador desse diagnóstico, mas também como indicador terapêutico na monitoração da resposta neoplásica pós tratamento (KURTZ & NIELSEN, 1985). Contudo, a busca por marcadores tumorais com maior especificidade e boa

sensibilidade para a detecção precoce ou acompanhamento de neoplasias do trato gastrointestinal não foi encerrada.

Elevações de CK total no soro resultam de uma liberação excessiva de CK-MM e CK-MB em diversas patologias neuromusculares (ARENAS et al, 1988).

Modelos isoenzimáticos de CK são sugeridos como marcadores comportamentais de diferenciações em rabdiossarcomas sendo utilizados especificamente para avaliações em diagnósticos e prognósticos (FERNANDEZ et al, 1994). Em alguns casos não somente têm-se uma elevação da isoenzima MB como também de lactato desidrogenase, podendo ambos, ser de grande utilidade como marcadores de rabdiossarcomas (Ng et al, 1987).

Estudos dos níveis de CK-MB ou CK-BB em neoplasias têm obtido resultados controversos. Lee et al demonstraram uma elevação nesses níveis de CK em carcinoma de pequenas células do pulmão, não havendo dentre exames patológicos e clínicos evidências de infarto, inflamação ou de neoplasias que envolvessem o coração (LEE et al, 1985). Shribiny et al observaram uma elevação de seus níveis em neoplasias avançadas da próstata (EL SHRIBINY et al, 1985). Estes resultados não foram confirmados por Lippo & Terho (LIPPO & TERHO, 1991) ou por Wong et al (WONG et al, 1987). Em tumores do trato digestivo, uma elevação dos níveis séricos e teciduais de CK BB foi relatada em 13 pacientes com adenocarcinoma gástrico por Hirata et al tendo os autores sugerido que a fonte desta fração seria a proliferação tumoral, já que seus níveis apresentaram uma queda após

realização de gastrectomia (HIRATA et al, 1985). Foi relatada por Lederer & Gersbrein elevação dos níveis da isoenzima BB em um paciente portador de adenocarcinoma gástrico (LEDERER & GERSTBREIN, 1976). Coolen et al também verificaram elevações nos níveis enzimáticos de CK-BB em adenocarcinomas pulmonares, de rim e cólon, bem como neoplasias com presenças de metástases. (COOLEN et al, 1979)

No entanto, houve uma elevação da isoenzima CK-BB em soro de pacientes portadores de neoplasias em células ósseas gigantes, sendo até sugerido como marcador do tipo. Essa elevação ocorreu em soro de indivíduos em pré operatório, tendo seus níveis de CK-BB diminuídos após ato cirúrgico (FUKUDA, 1994).

Todavia, de acordo com Joseph et al a atividade da CK não têm se elevado muito em casos de pacientes portadores de carcinomas pulmonares, de cólon e fígado; ocorrendo em algumas neoplasias um decréscimo na expressão de CK-MM. Quanto a atividade de CK-BB, há uma elevação desta em soro de pacientes portadores de carcinoma de pequenas células do pulmão, carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas de pulmão, sendo que em adenocarcinoma de cólon, os pacientes encontravam-se em estádios avançados. Portanto, essa elevação de CK-BB ocorre possivelmente devido a uma acentuada liberação enzimática ocasionada por uma necrose da célula neoplásica (JOSEPH et al, 1997).

Baseado em Zarghami et al os níveis de CK-BB têm se elevado em pacientes mais jovens, portadores de neoplasia de mama, sem nenhuma associação com outras características clínicas e patológicas sendo, para tanto,

utilizada na seleção de pacientes, adequados a receber um tratamento de substratos de CK na tentativa de romper o metabolismo energético de células neoplásicas (ZARGHAMI et al, 1996).

Segundo Ward & Cockayne a isoenzima CK-MM representa 94 a 100% da atividade total da CK no soro. A CK-MB se encontra em concentrações mínimas. inferiores a 6% e a CK-BB quase nunca se detecta sem ser mediante técnicas analíticas muito sensíveis (WARD & COCKAYNE, 1993).

Como elevações dos níveis de creatina fosfoquinase poderiam surgir em células com atividade elevada (por exemplo neoplasias), bem como em situações com lesão de órgãos ricos na mesma (ZARGHAMI et al, 1996; TSUNG, 1982; TSUNG, 1982), avaliamos pacientes com neoplasias do trato gastrointestinal, bem como portadores de enfermidades digestivas caracterizadas por inflamação e/ou destruição celular, buscando avaliar a possibilidade da utilização das frações da creatina fosfoquinase como marcador específico de neoplasias gastrointestinais. Inicialmente acreditávamos que a CK-BB seria a que mais adequar-se-ia aos nossos propósitos, por ser a subunidade da enzima predominante no trato gastrointestinal (COOLEN et al, 1979).

Os resultados obtidos descartam o possível uso da CK-BB como marcador de lesão tecidual nos pacientes avaliados, já que a mesma foi detectada em apenas um dos indivíduos estudados. No entanto, foi identificada eletroforeticamente uma fração anômala de CK, como sendo a CK-MiMi. Tal fração foi anteriormente descrita como sendo característica de neoplasia,

representando, provavelmente, uma fração mitocondrial (SIRAGELDIN & KLAPDOR, 1985). Além de ter sido detectada pela primeira vez em um portador com síndrome de Reye, sua presença no soro pode estar associada com adenocarcinomas indicando um aumento na taxa de mortalidade (PRATT et al, 1987). Em diversos tecidos, a distribuição enzimática da CK têm sido discutida, principalmente quanto à sua elevação. De acordo com Okano et al além da presença elevada de CK-BB em soro de pacientes portadores de neoplasias, uma isoenzima de grande importância como marcadora de adenocarcinoma é a CK mitocondrial (OKANO et al, 1987).

Apenas oito pacientes portadores de adenocarcinoma (gástrico ou de cólon/reto) apresentaram esta fração, dos quais seis apresentavam metástases em linfonodos regionais, ou a distância e dois pacientes não apresentavam metástases clinicamente detectáveis.

Curiosamente os portadores de neoplasias gastrointestinais, quando avaliados como grupo, apresentaram uma redução significativa dos níveis séricos de CK-MM, quando comparados com os outros grupos estudados. Ao subdividirmos os portadores de neoplasias, de acordo com a etiologia e estadio da enfermidade, observamos que esta redução se dá principalmente nos portadores de adenocarcinoma (gástrico ou de cólon/reto). A causa dessa redução, bem como a possibilidade da utilização dos valores de CK-MiMi como indicador de adenocarcinoma do trato gastrointestinal merecem avaliação mais detalhada.

6. CONCLUSÃO

Em 95 indivíduos avaliados, portadores ou não de patologias gastrointestinais, verificou-se em oito pacientes com adenocarcinomas gástricos e intestinais a identificação eletroforética de uma fração anômala de CK, como sendo a CK-MiMi.

Houve também a verificação de uma redução significativa dos níveis séricos de CK-MM em portadores de neoplasias quando comparado aos outros grupos, tendo essa redução ocorrido em adenocarcinomas gástricos e intestinais quando da comparação feita entre os grupos controle e neoplasia esofágica. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre os grupos de neoplasias com a redução de CK-MM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Axelrad. A. M.; and Fleischer. D. E. Esophageal Tumors. Feldman. M., Scharschmidt. B. F., and Sleisenger. M. H. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 1998. 6^a edição. 1: 540-551.

Bereznitsky. S.; Lobstein. O. E.; Ko. S.; and Weinstock. A. Alterations of Creatine Kinase Isoenzymes in colon Washings from Patients with Colonic and Rectal Diseases. *Cancer*. 1982. **50**: 1177-1180.

Bessman. S. P., and Carpenter. L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Ann Revv Biochem*. 1985. **54**: 831-862.

Brosnan. M. J.; Raman. S. P.; Chen. L.; and Koretsky. A. P. Altering creatine kinase isoenzymes in transgenic mouse muscle by overexpression of the B subunit. *Am J Physiol*. 1993. **264**/33: C151-160.

Bunworasate. U.; and Voravud. N. CA 50: A Tumor Marker for Gastrointestinal Malignancies. *J Med Assoc Thai*. 1995. **78**/5: 255-269.

Camarozano. A. C. A.; and Henriques. L. M. G. Uma macromolécula capaz de alterar o resultado da CK-MB e induzir ao erro diagnóstico de infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 1996. **66/3**: 143-157.

Castro. L. P.; Oliveira. C. A.; and Andrade. J. M. Gastrites. Dani. R. and Castro. L. P. *Gastroenterologia Clínica.* 1993. 3^a edição. 1: 562-585.

Chan. D. W.. and Sell. S. Tumors Markers. Burtis. C. A.. and Ashwood. E. R. *Clinical Chemistry.* 1999. **23**: 722-749.

Cooke. M.;and Sande. M. Diagnosis and outcome of bowel infarction on an acute medical service. *Am J Med.* 1983. **75**: 984-92.

Coolen. R. B.; Pragay. D. A.; Nosanchuk. J. S.; and Belding. R. Elevation of Brain-Type Creatine Kinase in Serum from Patients with Carcinoma. *Cancer.* 1979. **44**: 1414-1418.

De Sousa. E., Veksler. V., Minajeva. A., Kaasik. A., Mateo. P., Mayoux. E., Hoerter. J., Bigard. X., Serrurier. B., and Ventura-Clapier. R. Subcellular Creatine Kinase Alterations/Implications in Heart Failure. *Circ Res.* 1999. **85**: 68-76.

Doran. G.R. Appearance of creatine kinase BB isoenzyme in the serum of a patient suffering from infarction of the colon. *Clin Chim Acta.* 1979. **92**: 415-9.

El-Shribiny. A.; Bharvaga. A.; Fitzpatrick. J.; and Murphy. G. P. Creatine Kinase Isoenzyme (CK-BB) by RIA as a Follow-up Marker in Stage D Cancer of the Prostate: Comparison With PAP RIA. *Journal of Surgical Oncology.* 1985. **28**. 232-236.

Enjolras. N.; and Godinot. C. Inhibition of ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in Hela cells by an antisense oligodeoxynucleotide. *Mol Cell Biochem.* 1997. **167**: 113-125.

Fernandez. J. E.; Prados. J.; Melguizo. C.; Rodriguez. F.; Alvarez. L.; and Aránega. A. Creatine Kinase Isoenzymes as Markers of Differentiation in Rhabdomyosarcoma Cells in Culture. *Path Res Pract.* 1994. **190**: 1169-1173.

Ferrigno. D.; and Buccheri. G. Clinical Applications of serum markers for lung cancer. *Res Med.* 1995. **89**: 587-597.

Forones. N. M.; Del Grande. J. C.; and Haddad. C. M. Neoplasias do Esôfago. Mincis. M. *Gastroenterologia & Hepatologia.* 1997: 249-257.

Fried. M. W.; Murthy. U. K.; Hassig. S. R.; Woo. J.; and Oates. R. P. Creatine Kinase Isoenzymes in the Diagnosis of Intestinal Infarction. *Dig Dis Sci.* 1991. **36/11**: 1589-1593.

Fritz-Wolf. K.; Schnyder. T.; Wallimann. T.; and Kabsch. W. Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature.* 1996. **381/23**: 341-345.

Fujimoto. H.; Ando. Y.; Yamashita. T.; Terazaki. H.; Tanaka. Y.; Sasaki. J.; Matsumoto. M.; Suga. M.; and Ando. M. Nitric Oxide Synthase Activity in Human Lung Cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1997. **88**: 1190-1198.

Fukuda. J.; Yagishita. S.; Yamaoka. K.; Hanihara. T.; Kushida. K.; and Murayama. H. Creatine Kinase Isoenzyme BB Increased in Serum and Tumor Tissue of Patients with Giant Cell Tumor of Bone. *Clin Chem.* 1994. **40/11**. 2064-2065.

Gorus. F.; Claessens. V.; Goubert. P.; and Laureys. M. A Sensitive Bioluminescent Immunoinhibition Test for CK-B Subunit Activity and a CK-MB Specific ELISA Compared: Correlation with Agarose Electrophoresis and Influence of CK-Isoenzyme Profile on Results. *Clin Chem.* 1988. **34/7**. 1474-1478.

Graeber GM. Caferty PJ. Reardon MJ. Curley CP. Ackerman NB e Harmon JW (1981a). Changes in serum total creatine phosphokinase (CPK) and its isoenzymes caused by experimental ligation of the superior mesenteric artery. *Ann Sur.* **193**: 499-505.

Graeber GM. Wukich DK. Caferty PJ. O'Neill JF. Wolf RE. Ackerman NB e Harmon JW (1981b). Changes in peripheral serum creatine phosphokinase (CPK) and lactate deshydrogenase (LDH) in acute experimental colonic infarction. *Ann Sur.* **194**: 708-15.

Graeber. G. M.; Caferty. P. J.; Wolf. R. E.; and Harmon. J. W. Na analysis of creatine phosphokinase in the mucosa and muscularis of the gastrointestinal tract. *J Sur Res.* **37**: 376-82.

U N I C A M P
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Habr-Gama. A., Alves. P.R.A., and Rodrigues. J.J.G. Tumores Malignos. Castro. L. P.; and Dani. R. Gastroenterologia Clínica. 1993. 3ª edição. 1: 1008-1021.

Hirata. R. D. C.; Hirata. M. H.; Strufaldi. B.; Possik. R. A.; and Asai M. Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum and Tissues of Patients with Stomach Adenocarcinoma. *Clin Chem.* 1989. 35/7. 1385-1389.

Hoag. G. N.; Franks. C. R.; and DeCoteau. W. E. Creatine Kinase isoenzymes in serum of patients with cancer of various organs. *Clin Chem* .. 1978. 24:1654.

Joseph. J.; Cardesa. A.; and Carreras. J. Creatine Kinase Activity and Isoenzymes in Lung, Colon and Liver Carcinomas. *Br J Cancer.* 1997. 76/5: 600-605.

Kahn. C. R.; Rosen. S. W.; Weintraub. D. B.; Fajans. S. S.; and Gorden. P. Ectopic production of corionic gonadotropin and its subunits by islet cell tumor: A specific marker of malignancy. *N Engl J Med.* 1977. 297: 565-569.

Kahrilas. P. J. Gastroesophageal Reflux Disease and its Complications. Feldman. M., Scharschmidt. B. F., and Sleisenger. M. H. Gastrointestinal and Liver Disease. 1998. 6^a edição. 1: 498-514.

Kaldis. P., and Wallimann. T. Functional differences between dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase. *Biochem J.* 1995. **308**: 623-627.

Kurtz. K. J.; and Nielsen. R. D. Serum Creatine Kinase BB Isoenzyme as a Diagnostic Aid in Occult Small Cell Lung Cancer. *Cancer.* 1985. **56**. 562-566.

Kwaan. J. H.; and Connolly. J. E. Prevention of intestinal infarction resulting from mesenteric arterial occlusive disease. *Surg Gynecol Obstet.* 1983. **157**: 321-4.

Laethem. V. J. L. Use of genetic markers during endoscopic screening and follow-up of gastrointestinal precancerous lesions. *Acta Gastroenterol Belg.* 1995. **58**: 187-192.

Lamar. W.; Woodward. L.; and Statland. B. Clinical Implications of Creatine Kinase BB isoenzyme. *N Eng J Med.* 1978. **299**: 834-835.

- Lederer. W. H.; and Gerstbrein. H. L. Creatine Kinase Isoenzyme BB Activity in Serum of a Patient with Gastric Cancer. *Clin Chem.* 1993. 22: 1748-1749.
- Lee. B. I.; Bach. P. M.; Horton. J. D.; Hickey. T. M.; and Davis. W. A. Elevated CK-MB and CK-BB in Serum and Tumor Homogenate of a Patient with Lung Cancer. *Clin Cardiol.* 1985. 8. 233-236.
- Lee. T. H.; and Goldman. L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Intern Med.* 1986. 105: 221-233.
- Liippo. K. K.; and Terho. T. Concomitant Monitoring of Serum Neuron-Specific Enolase and Creatine Kinase BB in Small Cell Lung Cancer. *Acta Oncologica.* 1991. 30/3. 321-324.
- Malafaia. O. Tumores. Dani. R. and Castro. L. P. *Gastroenterologia Clínica.* 1993. 3ª edição. 1: 428-449.
- Manoukian. N. Tumores Malignos do Aparelho Digestivo. Guimarães. R. X. and Guerra. C. C. C. *Clínica e Laboratório.* 1990. 4ª edição: 267-270.

Mattox. K. L.; and Guinn. G. A. Mesenteric Infarction. *Am J Surg.* 1973. **126**: 332-335.

Mayer. R. J. Cancer do trato gastrointestinal. Harrison. T. R. *Medicina Interna*. 1998. 14ª edição: 606-617.

MCging. P. G.; Teeling. M.; McCann. A.; Kyne. F.; and Carney. D. N. Non-M CK – a practical measure of creatine kinase isoenzymes in cancer patients. *Clin Chim Acta.* 1990. **187**: 309-316.

Meyer. R. A.. Sweeney. H. L.. and Kushmerick. M. J. A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am J Physiol.* 1984. **246/15**: C365-C377.

Mincis. M. Úlcera Péptica. Guimarães. R. X.; and Vilela. M. P. *Gastroenterologia.* 1979. 1ª edição: 35-51.

Moss. D. W.. and Henderson. R. Clinical Enzimology. Burtis. C. A.. and Ashwood. E. R. *Clinical Chemistry.* 1999. **22**: 617-721.

Ng. R. H.; Ethirajan. S.; O'Neill. M.; and Statland. B. E. Increased Activities of Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in a Patient with Metastatic Ovarian Tumor. *Clin Chem.* 1987. **33/8**: 1484-1485.

Niklinski. J.; Furman. M.; Laudanski. J.; Palynyczko. Z.; and Welk. M. Evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) and brain-type creatine kinase (CK-BB) in serum from patients with carcinoma of the lung. *Neoplasma.* 1991. **38/2**. 129-135.

Okano. K.; Yamamoto. K.; Ohba. Y.; Matsumura. K.; and Miyagi. T. Source of Elevated Serum Mitochondrial Creatine Kinase Activity in Patients With Malignancy. *Clin Chim Acta.* 1987. **169**: 159-164.

Olschwang. S.; Slezak. P.; Rose. M.; Jaramillo. E.; Nakano. H.; Koizumi. K.; Rubio. C. A.; Laurent-Puig. P.; and Thomas. G. Somatically Acquired Genetic Alterations in Flat Colorectal Neoplasias. *Int J Cancer.* 1998. **77**. 366-369.

Oshima. C. T.; Mandowsky. S.; and Forones. N. M. Marcadores Tumorais no Cancer do Aparelho Digestivo. Forones. N. M. *Compacta Gastroenterológica*. 1998/9.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ottinger. L. W. Acute mesenteric ischemia. *N Eng J Med*. 1982. **307**: 535-7.

Possik. R.; and Mincis. M. Câncer gástrico. . Mincis. M. Gastroenterologia & Hepatologia.. 1997: 343-359.

Pratt. R.; Vallis. L. M.; Lim. C. W.; and Chisnall. W. N. Mitochondrial Creatine Kinase in Cancer Patients. *Pathology*.. 1987. **19**. 162-165.

Rosen. S. W.; Weintraub. D.B.; and Vaitukaitus. J.L.; Sussman. H. H.; Hershman. J. M.; and Muggia. F. M. Placental proteins and their subunits as tumor markers. *Ann Int Med* .. 1975. **82**: 71-83.

Rustgi. A. K.. and Podolsky. D. K. Principles of Gastrointestinal Neoplasia. Feldman. M.. Scharschmidt. B. F.. and Sleisenger. M. H. Gastrointestinal and Liver Disease. 1998. 6^a edição. 1: 49-63.

Schneider. C.; Stull. G. A.; and Apple. F. S. Kinetic Characterization of Human Heart and Skeletal Muscle CK Isoenzymes. *Enzyme*.. 1988. **39**: 220-226.

Schwartz. J. G.; Bazan. C.; III.; Gage. C. L.; Prihoda. T. J.; and Gillham. S. L. Serum Creatine Kinase BB is a Poor Index to the Size of Various Brain Lesions. *Clin Chem*. 1989. **35/4**. 651-654.

Smith. K. O.; Gehle. W. D.; Newman. J. T.; Standley. D. L.; and Voltz. P. W. An Approach to the serodiagnosis of human lung cancer cell culture lines reactive as antigens with tumor patients sera. *Cancer.* 1976. **38**: 157-165.

Soll. A. H. Peptic Ulcer and its Complications. Feldman. M., Scharschmidt. B. F., and Sleisenger. M. H. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 1998. 6^a edição. 1: 621-678.

Tolentino. M. M.; Maguilnik. I.; Chinzon. D.; Quilici. F. A.; Strauss. E. *Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva em CD-ROM*. 1996/1998. vol. I.

Tsung. J. S. H. Creatine Kinase and its isoenzymes in neoplastic disease. *Circ Crit Revi Clin Lab Sci.* 1986. **23/1**: 65-75.

Tsung. S. H. Circulating CK-BB isoenzymes after gastrointestinal surgery. *J Clin Pathol.* 1982. **35**. 200-203.

Tsung. S. H. Creatine Kinase Activity and Isoenzyme Pattern in Various Normal Tissues and Neoplasms. *Clin Chem.* 1983. **29/12**. 2040-2043.

Vaitukaitus. J. L. Peptide hormones as tumor markers. *Cancer*. 1976. **37**: 567-572.

Vaubourdolle M. Chazouilleres O. Poupon R. et al (1993). Creatine Kinase-BB: a marker of liver sinusoidal damage in ischemia-reperfusion. *Hepatology* 17: 423-428.

Wallimann. T. Dissecting the role of creatine kinase. *Curr Biol*. 1994. **11** 4: 42-46.

Wallimann. T.; and Hemmer. W. III-2 Creatine Kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem*. 1994. **133/134**: 193-220.

Wallimann. T.; Wyss. M.; Brdiczka. D.; Nicolay. K.; and Eppenberger. H. M. Intracellular Compartmentation. Structure and Function of Creatine Kinase Isoenzymes in Tissues with High and Fluctuating Energy Demands: The 'Phosphocreatine Circuit' for Cellular Energy Homeostasis. *Biochem J*. 1992. **281**: 21-40.

Ward. K. M.. and Cockayne. S. Enzimologia . Anderson. S.C.. and Cockayne S. *Química Clínica*. 1993. **736**: 259-263.

Wong. S. S.; Wu. A. H. B.; and Fritsche. H. A. Reassessment of Creatine Kinase BB as a Marker for Cancer of the Prostate. *Breast. and Lung. Clin Chem.* 1987. **33/6**. 809-811.

Ylatupa. S.; Haglund. C.; Mertaniemi. P.; Vahtera. E.; and Partanen. P. Cellular fibronectin in serum and plasma: a potential new tumour marker? *Br J Cancer.* 1995. **71**: 578-582.

Yoneyama. T.; Fowler. H. L.; Pendleton. J. W.; Sforza. P. P.; Gerard. R. D.; Lui. C. Y.; Eldridge. T. H.; and Iranmanesh. A. Elevated serum levels of creatine kinase BB in autosomal dominant osteopetrosis type II – a family study. *Clin Genet.* 1992. **42**: 39-42.

Zarghami. N.; Giai. M.; Yu. H.; Roagna. R.; Ponzzone. R.; Katsaros. D.; Sismondi. P.; and Diamandis. E. P. Creatine Kinase BB isoenzyme levels in tumour cytosols and survival of breast cancer patients. *British Journal of Cancer.* 1996. **73**. 386-390.

Zaterka. S.; Magalhães. A. F. N.; Brailise. N.; Montes. C. G.; Iriya. K.; El Ibham. R. and Venco. F. E. *Imagens em Gastroenterologia.* 1998. **3**: 3-4.

8. APÊNDICE

**PERFIL DAS ISOFORMAS DA CREATINA
FOSFOQUINASE EM LESÕES DO TRATO
GASTROINTESTINAL**

Dias FE, Ecclissato C, Degger FM, Mazzini, D, Pedrazzoli JJ.

Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia. Universidade São Francisco. Av. São Francisco de Assis 218, 12 916-900 – Bragança Paulista – SP.

Autor Para Correspondência:

José Pedrazzoli Júnior

Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia.

Universidade São Francisco.

Av. São Francisco de Assis 218

12 916-900 – Bragança Paulista –SP.

Fax: 11- 7844 1825

e-mail: pedrazzoli@usf.com.br

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Resumo

Introdução: A determinação das isoenzimas da CK (MM, MB e BB) é de fundamental importância em diagnósticos clínicos de diversas patologias, bem como a determinação da relação entre a razão da CK-MB/CK TOTAL, utilizada como marcador específico para o diagnóstico diferencial de lesão do miocárdio. O objetivo desse estudo foi de avaliar o perfil eletroforético das isoformas MM, MB e BB como marcador de lesões do trato gastrointestinal gastrointestinal.

Pacientes e Métodos: Foi avaliado um grupo de 95 pacientes, de ambos os sexos, com idade média de 44.63 ± 1.81 anos, divididos em 5 grupos, dos quais 15 eram normais e foram utilizados como controle, 17 portadores de gastrite enantematosa de antro, 16 pacientes com úlcera péptica, 16 indivíduos com esofagite péptica, e 31 portadores de neoplasias esofágicas, gástricas ou de cólon/reto. As isoenzimas foram individualizadas e identificadas por eletroforese em gel de agarose.

Resultados: Nos portadores de gastrite, úlcera ou esofagite não foram observadas diferenças significativas da isoforma MM, quando comparada com o grupo controle. No entanto, em pacientes portadores de neoplasias foi observado um decréscimo de 24% desta isoforma. Em alguns destes pacientes verificou-se uma forma anômala de MM, denominada MiMi (mitocondrial).

Conclusões: Uma redução dos níveis séricos de CK-MM pôde ser observada em pacientes portadores de neoplasias do trato gastrointestinal, quando comparados com portadores de outras enfermidades digestivas ou controles saudáveis. O potencial diagnóstico desde achado, bem como as suas causas merecem uma investigação detalhada.

INTRODUÇÃO

A creatina kinase (CK; EC 2.7.3.2) é uma enzima que cataliza a fosforilação reversível entre creatina e ATP, e possui um papel importante no metabolismo energético (1). Possui estrutura dimérica (por combinação das subunidades M e B), da qual tem se descrito, até o presente, três isoformas, denominadas de acordo com o tecido no qual é mais abundante: MM (músculo esquelético), MB (miocárdio) e BB (cérebro e músculo liso, sendo a maior parte da CK encontrada na bexiga, pulmão estômago e intestino). Sujeitos normais apresentam no soro quase exclusivamente a forma MM, com traços de MB e BB (2).

Concentrações elevadas de creatina fosfoquinase poderiam surgir em células com atividade elevada (por exemplo neoplasias), bem como em lesão de órgãos ricos na mesma (1;3;4), sendo que uma variedade de situações clínicas com degeneração ou trauma muscular elevam os níveis de CK-MM (2).

A utilidade da CK-MB para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio tem sido suficientemente documentada. A necrose das células miocárdicas leva a uma liberação da CK intracelular que pode ser medida no sangue periférico por um período de 4 - 8 horas (5).

Processo semelhante pode ocorrer nas situações de isquemia ou infarto mesentérico, já que as isoformas da CK foram descritas tanto na mucosa como na musculatura do trato gastrointestinal (6). Os sinais e sintomas clínicos de infarto intestinal são inespecíficos, dificultando, desta forma, o seu diagnóstico (7;8). No momento do aparecimento dos sinais de peritonite, acidose e choque, o prognóstico é pobre (9). Pacientes diagnosticados com infarto mesentérico chegam a representar 0.2% das admissões e 2% dos óbitos de uma instituição hospitalar (10). Modelos experimentais de infarto mesentérico, mostraram um aumento significativo das isoformas de CK (11;12). Casos isolados de aumento de CK-BB em pacientes com infarto mesentérico foram relatados (13;14). Experimentalmente, a elevação de CK-BB também foi encontrada em casos de dano hepático isquêmico seguido de reperfusão (15).

Algumas neoplasias podem ser caracterizadas ou monitoradas pela presença ou produção de certos marcadores, como antígenos, proteínas ou hormônios (16;17;18;19).

Além de apresentar-se elevada em casos de necrose isquêmica de tecidos do trato gastrointestinal, elevação da CK-BB tem sido descrita em casos de neoplasias de pulmão, estômago e intestino (2;3;4; 20;21;22;23;24), mas a sua possível utilidade como marcador sorológico de neoplasias gastrointestinais ou mesmo de outras lesões do trato digestivo, em que ocorre destruição ou proliferação tecidual, como esofagite ou úlceras pépticas, não é conhecida.

O objetivo deste estudo prospectivo foi o de avaliar o comportamento das isoformas da CK em lesões do trato gastrointestinal que cursam com destruição ou proliferação tecidual.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

Unidade de Gastroenterologia e Farmacologia Clínica da USF, com diagnóstico de:

- 15 controles sadios, selecionados entre os pacientes do ambulatório de gastroenterologia que necessitaram de endoscopia digestiva. Os controles não apresentaram sinais ou sintomas evidentes de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica, com base na história clínica, nos exames físico e psiquiátrico, endoscopia digestiva (alta e/ou baixa), e nos seguintes exames laboratoriais: glicemia, uréia, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina, gamma GT, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina e protoparasitológico. Além disso, não apresentavam quadro clínico sugestivo ou antecedentes de neoplasia, não pertenciam a grupos de risco para neoplasias de trato gastrointestinal, e não foram submetidos a cirurgias abdominais ou torácicas anteriores.

- 17 pacientes com gastrite de antro, diagnosticadas por meio de endoscopia e portadores de *H. pylori*, com diagnóstico feito por meio de teste de urease rápido e pesquisa histológica com coloração hematoxilina eosina e Giemsa.

- 16 pacientes com esofagite péptica, classificados de acordo com Savary Miller.

- 16 pacientes com úlcera péptica A1, A2 ou H1, classificados de acordo com Sakita .

- 31 pacientes portadores de neoplasias do trato gastrointestinal. Estes foram classificados de acordo com a enfermidade de base em neoplasias de cólon/reto, esofágicas e gástricas, e estadiados de acordo com a classificação TMN (neoplasias de esôfago e estômago) ou DUKE'S para neoplasias de cólon/reto.

Todos os participantes assinaram termo de consentimento esclarecido e o protocolo clínico foi aprovado pelo CEP-USF.

Determinação dos níveis séricos das isoformas da CK

A coleta de material foi feita através de uma punção venosa, com retirada de 5 ml de sangue, em tubo seco (sem anticoagulante). Após a coagulação, o material foi centrifugado a 800 g por 10 min, e o soro, utilizado para as determinações. A concentração da CK total foi determinada por meio de procedimento automatizado (Cobas Mira Plus, Roche, CK UNIMATE Roche, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, S. Paulo, Brasil), e a determinação das isoformas de CK feita por meio de eletroforese em agarose, conforme (15;25), utilizando-se o Kit CPK AGARO STAIN (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA). A concentração relativa de cada fração foi avaliada por densitometria do gel, utilizando-se o programa para computador SIGMAGEL (Jandel Software, San Raphael, CA, USA).

Os resultados foram avaliados quanto a significância pelo teste de Mann-Whitney. Um $p < 0.05$ foi utilizado para determinar a diferença significativa entre os resultados obtidos.

Resultados

A distribuição dos participantes nos diversos grupos de estudo está apresentada nas Tabelas 1 e 2. Tanto indivíduos normais (controles sadios) bem como os portadores de lesões benignas do trato gastrointestinal, apresentaram apenas a banda MM na eletroforese.

Indivíduos portadores de diferentes tipos de neoplasias como: esofágicas ($38.23 \text{ U/l} \pm 13.46$), gástricas ($7.90 \text{ U/l} \pm 3.89$) e colorretais ($11.76 \text{ U/l} \pm 4.75$), apresentaram uma redução significativa nos níveis séricos de CK-MM, quando comparados aos demais grupos avaliados (Tabelas 3, Figura 1). Portadores de adenocarcinoma apresentaram uma maior redução dos níveis sanguíneos de CK MM do que portadores de carcinoma epidermóide (Tabela 4, Figura 2), embora estatisticamente não significativa, sendo que esta redução não se correlacionou com o estadiamento da neoplasia (Tabela 5).

Apenas um paciente, portador de neoplasia de esôfago apresentou banda de fração BB à eletroforese. Oito pacientes portadores de neoplasias (quatro gástricas e quatro colorretais) apresentaram uma banda anômala, descrita como sendo CK MiMi (tabela 6), sendo que seis destes apresentavam neoplasia metastática e dois, neoplasia sem metástases detectáveis clinicamente.

Discussão

A caracterização de células malignas ou alteradas tem levado à tentativas de identificação de marcadores que pudessem ser úteis na identificação precoce de neoplasias gastrointestinais. Os métodos mais utilizados tem sido baseados na antigenicidade de constituintes da superfície celular. O primeiro destes marcadores a ser utilizado, com base neste princípio, é o antígeno carcino embriogênico (CEA). A avaliação clínica da utilidade deste marcador em pacientes com neoplasia colorretal, durante 25 anos, tem demonstrado seu valor, mas também suas limitações, como a possibilidade de elevação de seus níveis em enfermidades com multiplicação celular e inflamação, mas ausência de neoplasia (26). Assim, a busca por marcadores tumorais com maior especificidade e boa sensibilidade para a detecção precoce ou acompanhamento de neoplasias do trato gastrointestinal ainda não foi encerrada .

Estudos dos níveis de CK MB ou BB em neoplasias têm obtido resultados controversos. Kurtz & Nielsen descreveram uma elevação de seus níveis em pacientes com adenocarcinoma pulmonar (27), e Shribiny et cols. também observaram uma elevação de seus níveis em neoplasias avançadas da próstata (28). Estes resultados não foram confirmados por Lippo & Terho (29) ou por Wong et cols. (30). Em tumores do trato digestivo, uma elevação dos níveis séricos e teciduais de CK BB foi relatada em 13 pacientes com adenocarcinoma gástrico por Hirata et cols, tendo os autores sugerido que a fonte desta fração seria a proliferação neoplásica, já que seus níveis apresentaram uma queda após realização de gastrectomia (20). Segundo Ward & Cockayne a isoenzima CK-MM representa 94 a 100% da atividade total da CK no soro. A CK-MB se encontra em concentrações mínimas, inferiores a 6% e a CK-BB é geralmente indetectável, exceto pelo emprego de técnicas não rotineiras(31).

Como elevações dos níveis de creatina fosfoquinase poderiam surgir em células com atividade elevada (por exemplo neoplasias), bem como em situações com lesão de órgãos ricos na mesma (1;3;4), avaliamos pacientes com neoplasias do trato gastrointestinal, bem como portadores de enfermidades digestivas caracterizadas por inflamação e/ou destruição celular, buscando avaliar a possibilidade da utilização das frações da creatina fosfoquinase como marcadores específicos de lesões gastrointestinais. Inicialmente acreditávamos que a

CK-BB seria a que mais adequar-se-ia aos nossos propósitos, por ser a subforma da enzima predominante no trato gastrointestinal (2).

Os resultados obtidos descartam o possível uso da CK-BB como marcador de lesão tecidual nos pacientes avaliados, já que a mesma foi detectada em apenas 01 (um) dos indivíduos estudados. No entanto, foi identificada uma fração anômala de CK, definida como sendo a CK MiMi. Tal fração foi anteriormente descrita como característica de neoplasia, representando, provavelmente, uma fração mitocondrial (32). Apenas 8 pacientes portadores de adenocarcinoma (gástrico ou de colon/reto) apresentaram tal fração, dos quais 6 apresentavam metástases em linfonodos regionais, ou a distância e 2 pacientes não apresentavam metástases clinicamente detectáveis.

Curiosamente, os portadores de neoplasias gastrointestinais, quando avaliados como grupo, apresentaram uma redução significativa dos níveis séricos de CK-MM, quando comparados com os outros grupos estudados. Ao subdividirmos os portadores de neoplasias, de acordo com a etiologia e estadió da enfermidade, observamos que esta redução se dá principalmente nos portadores de adenocarcinoma (gástrico ou de cólon/reto), independente do estágio da enfermidade. Tal fato ainda não havia sido relatado. A causa dessa redução, bem como a possibilidade da utilização dos valores de CK-MM como indicador de adenocarcinoma do trato gastrointestinal merecem avaliação mais detalhada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Zarghami N, Giai M., Roagna R, et al (1996). Creatine kinase BB isoenzyme levels in tumour cytosols and survival of breast cancer patients. *Br J Cancer*, 386-390.
- (2) Coolen RB, Praga DA, Nosanchur JS e Belding R (1979). Elevation of brain-type vcreatine kinase in serum from patients with carcinoma. *Cancer*, 44: 1414-8.
- (3) Tsung SH (1982). Circulating CK-MB and CK-BB isoenzymes after gastrointestinal surgery. *J Clin Pathol* 35: 200-203
- (4) Tsung SH (1982). Total CK activity and isoenzyme patterns in normal and neoplastic tissue of gastrointestinal tract. *J Clin Pathol* 35: 204-206
- (5) Lee TH, Goldman L (1986). Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*, 105: 221-33.
- (6) Graeber GM, Caferty PJ, Wolf RE, e Harmon JW (1984). Na anlysis of creatine phosphokinase in the mucosa and muscularis of the gastrointestinal tract. *J Sur Res*, 37: 376-82.
- (7) Mattox KL e Guinn GH (1973). Mesenteric infarction. Diagnostic and therapeutic enigmas. *Am J Surg*, 126: 332-5.
- (8) Kwaan JH e Connolly JE (1983). Prevention of intestinal infarction resulting from mesenterial arterial occlusive disease. *Surg Gynecol Obstet*, 157: 321-4.
- (9) Ottinger LW (1982). Acute mesenteric ischemia. *N Eng J Med*, 307: 535-7.
- (10) Cooke M e Sande M (1983). Diagnosis and outcome of bowel infarction on an acute medical service. *Am J Med*, 75: 984-92.
- (11) Graeber GM, Caferty PJ, Reardon MJ, Curley CP, Ackerman NB e Harmon JW (1981a). Changes in serum total creatine phosphokinase (CPK) and its isoenzymes caused by experimental ligation of the superior mesenteric artery. *Ann Sur*, 193: 499-505.
- (12) Graeber GM, Wukich DK, Caferty PJ, O'Neill JF, Wolf RE, Ackerman NB e Harmon JW (1981b). Changes in peripheral serum creatine phosphokinase (CPK) and lactate deshydrogenase (LDH) in acute experimental colonic infarction. *Ann Sur*, 194: 708-15.

- (13) Lamar W, Woodward L e Statland B (1978). Clinical implications of creatine kinase BB isoenzyme. *N Eng J Med*, **299**: 234-5.
- (14) Doran GR (1979). Appearance of creatine kinase BB isoenzyme in the serum of a patient suffering from infarction of the colon. *Clin Chim Acta*, **92**: 415-9.
- (15) Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Poupon R, et al (1993). Creatine Kinase-BB: a marker of liver sinusoidal damage in ischemia-reperfusion. *Hepatology*, **17**: 423-428
- (16) Smith KO, Gehle WD, Newman JT, et al (1976). Na approach to the serodiagnosis of human lung cancer: cell culture lines reactive as antigens with tumor patients sera. *Cancer*, **38**: 157-165
- (17) Vaitukaitus JL (1976). Peptide hormones as tumor markers. *Cancer*, **37**: 567-572
- (18) Kahn CR, Rosen SW, Weintraub DB, et al (1977). Ectopic production of corionic gonadotropin and its subunits by islet cell tumor: A specific marker of malignancy. *N Engl J Med*, **297**: 565-569
- (19) Rosen SW, Weintraub DB, Vaitukaitus JL, et al (1975). Placental proetins and their subunits as tumor markers. *Ann Int Med*, **82**: 71-83
- (20) Hirata RDC, Hirata MH, Strufaldi, et al (1989). Creatine Kinase and Lactase Dehydrogenase Isoenzymes in serum and tissues of patients with stomach adenocarcinoma. *Clin Chem*, **35**: 1385-1389
- (21) Tsung SH (1983). Creatine Kinase activity and Isoenzyme pattern in various normal tissues and neoplasms. *Clin Chem*, **29**: 2040-2043
- (22) Niklinski J, Furman M, Laudanski J, et al (1991). Evaluation of carcinoembryogenic antigen (CEA) and brain-type creatine kinase (CK-BB) in serum from patients with carcinoma of the lung. *Neoplasma*, **38**: 129-135
- (23) Hoag GN, Franks CR, DeCoteau WE (1978). Creatine Kinase isoenzymes in serum of patients with cancer of various organs. *Clin Chem*, **24**: 1654
- (24) Lederer WH, Gerstbrein HL (1993). Creatine Kinase isoenzyme BB activity in serum of a patient with gastric cancer. *Clin Chem*, **22**: 1748-1749
- (25) Gorus F, Claessens P, Goubert P, et al (1988). A sensitive bioluminescent immunoinhibition test for CK-B subunit activity and a CK-MB specific ELISA compared:

correlation with agarose electrophoresis and influence of CK-isoenzyme profile on results. *Clin Chem* **34**: 1474-1478

- (26) Rustgi AK, Podolsky DK. Principles of gastrointestinal neoplasia. In Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisinger MH (eds.), Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and liver disease, 6th ed, Saunders, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 49-65, 1998
- (27) Kurtz KJ, Nielsen RD (1985). Serum Creatine Kinase BB isoenzyme as a diagnostic aid in occult small cell lung cancer. *Cancer* **56**: 562-566
- (28) El-Shribiny A, Bhavaga A, Fitzpatrick J, Murphy G (1985). Creatine Kinase isoenzyme (CK-BB) by RIA as a follow-up marker in satge D cancer of the prostate: comparison with PAP RIA. *J Surg Oncol*, **28**:232-236
- (29) Lippo KK, Terho T (1991). Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer. *Acta Oncol*, **30**: 321-324
- (30) Wong SS, Wu AH, Fritsche(1987). Reassessment of creatine kinase BB as a marker for cancer of the prostata, breast, and lung . *Clim Chem*, **33**: 809-811
- (31) Ward KM, and Cockayne S(1993). Enzimologia . Anderson SC, and Cockayne S. *Química Clínica*, **736**: 259-263.
- (32) SiragEldin E, Klapdor R (1985). Creatine kinase isoenzymes: biochemical findings after therapeutical embolization of the hepatic artery in two patients with liver metatstasis of an islet cell carcinoma or a carcinoid tumor. *Klin Wochenschr*, **63**:257-261

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabelas

Tabela 1.: Distribuição dos participantes segundo grupos de interesse.

Grupos de Estudo	N
Neoplasia	31
Normal	15
Esofagite	16
Gastrite	17
Ulceras	16

Tabela 2.:Distribuição de neoplasias de acordo com os diversos tipos de grupos analisados.

TOTAL DE NEOPLASIAS	31
NEOPLASIA DE CÔLON/RETO	13
NEOPLASIA DE ESÔFAGO	7
NEOPLASIA GÁSTRICA	11

Tabela 3.: Valores de CK-MM encontrados nos diversos grupos de estudo.

	CK – MM U/l (média ± EPM)	P
Neoplasia (n = 23)	18.64 ± 5.22	
Normal (n = 15)	61.56 ± 11.43	0.005 #
Esofagite (n = 16)	88.83 ± 20.72	0.001 #
Gastrite (n = 17)	55.47 ± 13.06	0.05 #
Úlcera (n = 16)	82.57 ± 17.21	0.005 #

em relação a portadores de neoplasias

Tabela 4: Valores de CK-MM encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas.

NEOPLASIA	CK-MM U/l (média ± EPM)	P
Esofágica (n = 7)	38.23 ± 13.46	n.s.
Gástrica (n = 7)	7.90 ± 3.89	n.s.
Colorretal (n = 9)	11.76 ± 4.75	n.s.

Tabela 5: Distribuição dos valores de CK-MM U/l encontrados de acordo com a classificação TNM (neoplasias esofágicas e gástricas) e DUKE'S (neoplasias de cólons e reto) para os pacientes portadores de neoplasia.

CK-MM U/l (MÉDIA ± EPM)						
NEOPLASIA	TNM			DUKE'S		
	IA	III	IV	A	B	C
ESOFÁGICA (n=7)		43.77±21.01 (n=3)	34.08±20.02 (n=4)			
GÁSTRICA (n=7)	8.63 (n=1)		7.78±4.60 (n=6)			
COLORRETAL (n=9)				7.73 (n=1)	14.85±6.92 (n=6)	4.51±1.98 (n=2)

Tabela 6.: Valores de CK Mitocondrial encontrados em neoplasias gástricas e colorretais.

Neoplasia	CK-MiMi U/l (média ± EPM)	P
Gástrica (n = 4)	33.09 ± 16.74	n.s.
Cólon/reto (n = 4)	21.55 ± 11.38	n.s.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Grafico I: Valores de CK-MM U/l encontrados nos diversos tipos de pacientes

*** p < 0.05 comparado com os demais grupos**

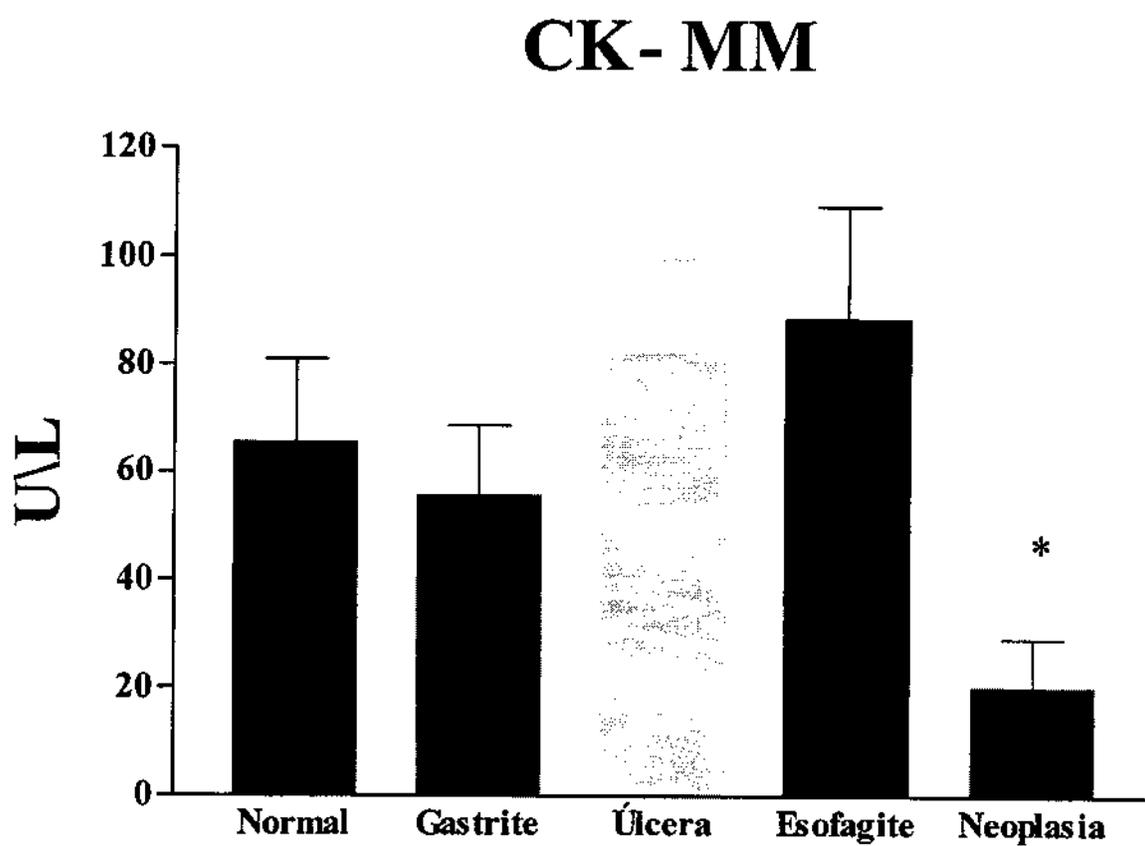
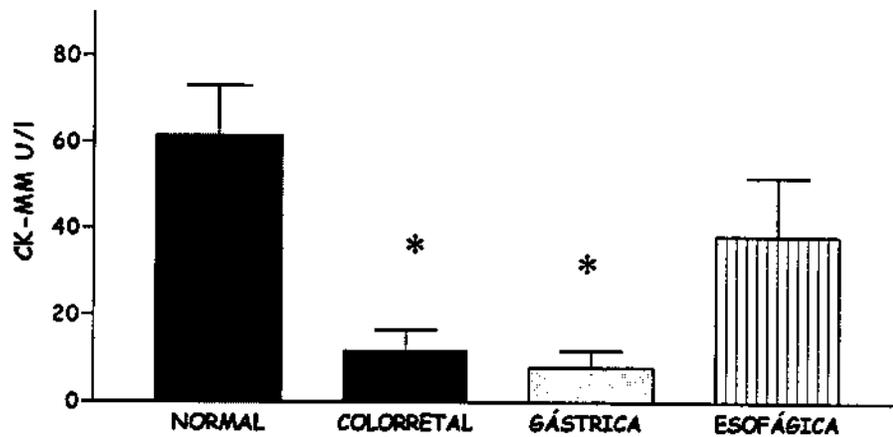


Grafico II: Valores de CK-MM U/l encontrados nos diversos tipos de neoplasias analisadas, onde:

*** p < 0.005 comparado com o grupo controle**



Anexo I

Nome Registro

idade sexo

endoscopia:

colonoscopia

Anatomopatológico (quando avaliável)

Ultrassonografia/ RX/ CT

Laboratório

Neoplasia (classificação TMN):

CK frações:

CK total:

O uso da CK-BB como marcador de lesões gastrointestinais.

Eu, _____, _____ anos, residente
à Rua _____ na cidade de
_____, RG _____, Registro _____ abaixo

assinado declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado de responsabilidade do Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior do Hospital da USF. O abaixo-assinado está ciente que:

1. O objetivo da pesquisa é verificar alterações dos níveis sanguíneos da enzima creatino fosfoquinase fração BB em doenças do trato gastrointestinal.
2. Para este estudo será necessária a realização de uma coleta de sangue.
3. A participação neste estudo poderá acarretar um benefício terapêutico.
4. Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação do referido estudo.
5. Está livre para não participar do estudo, e a não participação não acarretará nenhum prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do HUSF.
6. Os resultados obtidos por este ensaio serão mantidos em sigilo, e o Hospital da USF não identificará o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
7. Poderá contactar o Comitê de Ética e Pesquisa da USF para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Bragança Paulista, de de 199 .

nome do voluntário :

Dr. José Pedrazzoli Júnior

GED - GASTROENTEROLOGIA E ENDOSCOPIA DIGESTIVA

Órgão oficial da Federação Brasileira de Gastroenterologia (FBG)

Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (SOBED)

Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH)

São Paulo, 13 de março de 2000

SEG. 48/2000

Dr.(a) JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR

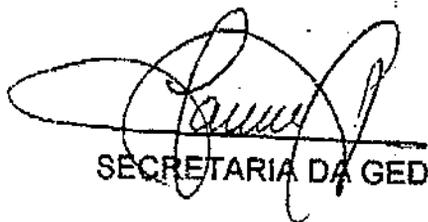
Fax: 7844-1825

Prezado(a) Senhor(a):

Acusamos o recebimento do seu trabalho intitulado (PERFIL DAS ISOFORMAS DA CREATINA FOSFOQUINASE EM LESÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL), que será encaminhado para análise.

Agradecendo o envio do trabalho, firmamo-nos,

Atenciosamente,


SECRETARIA DA GED