UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
FARMÁCIA
Área de Análises Clínicas

DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DA ATP:CREATINA-FOSFOTRANSFERASE (E.C. 2.7.3.2) E DA L-LACTATO:NAD-OXIDORREDUTASE (E.C. 1.1.1.27) E DE SUAS ISOENZIMAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE NEOPLASIAS GÁSTRICAS

ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO HIRATA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. BRUNO STRUFALDI

São Paulo

1987

11456

À DEUS...

A meus pais Jesus e Delia e irmãs Isabel e Marina
pelo amor, dedicação e exemplo de vida que
foram as bases da minha formação humana.

Ao meu marido Mário e meu filho Thiago
pelo carinho e compreensão que
tornaram possível a realização
deste trabalho.

Ao prof. Dr. Bruno Strufaldi
pelo apoio e incentivo
no início da minha car
reira científica e pe-
criteriosa orientação
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor Prof. Dr. João Haikal Helou, que nos acolheu permitindo o desenvolvimento de nossa carreira universitária.

. Aos colegas da disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Durval M. Nogueira, Prof. Dr. Raul C. Maranhão e Profa. Dra. Dulcinéia S. P. Abdalla, pelas críticas e sugestões.

. Ao Prof. Dr. Mario H. Hirata, da disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo inestimável auxílio e valiosas sugestões na condução experimental deste trabalho.

. Aos membros do Departamento de Cirurgia Abdominal - Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente, Prof. Dr. Alfredo Abrão, Dr. Rafael A. Possik, Dr. Mario Asai, Dr. Delmas R. R. Pires, Dr. Durval R. Wornrath e Dr. Renato S. L. Cappellano, pela valiosa colaboração na obtenção de amostras e pelos esclarecimentos prestados.

. Ao Serviço de Anatomia Patológica - Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente, em nome do seu diretor Dr. Jesus Carlos Machado e, em particular, à Dra. Marina S. Oyafuso pelos serviços prestados.

. À D. Hirde Contesini, chefe do Serviço de Arquivos Médicos e Estatística - Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente, pelo acesso aos prontuários médicos.

. À Profa. Junko Machida, da Faculdade de Educação Física da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização da análise estatística e pela amizade.

. À farmacêutica-bioquímica Ely S. Kubota pela colaboração na obtenção de amostras.

. À srta. Noemia R. dos Santos pela revisão das referências bibliográficas.

. À CODAC em nome do seu coordenador Sr. Orlando P. Miranda e à srta. Soraia Ferreira, pelos serviços prestados.

. À srta. Marta Junoski pelos serviços datilográficos.

. Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial, aqueles do Setor de Bioquímica Clínica: Georgina Pedrosa, Maurício dos Santos, Roberto Ferolla, Lucy Rocha, Margarida Tavityan, Ricardo Omoto, Sonia M. Nomura, Vicente Feitosa, Mrieta F. Zacarias, Carmem Lucia Moura, Thais B. César, Suzana R. Pedroso, Ivete A. Rolan, Marcia I. Otta, Renato C. Baena e Rosa J. Gonzales, pelo carinho e incentivo.

. Ao Prof. Dr. Paulo S. Minami, da disciplina de Parasitologia e Micologia Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo imestimável auxílio no início de minha carreira científica.

. Aos amigos do Laboratório Clínico do Instituto Iguatemi de Clínicas e Pronto Socorro S/A, em nome do seu chefe Dr. Fabio Valdetaro, pelo carinho e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. PROPOSIÇÃO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Casuística	12
3.1.1 Grupo de estudo	12
3.1.2 Grupo controle	12
3.2 Colheita dos materiais	15
3.2.1 Amostras de sangue	15
3.2.2 Amostras de tecido gástrico	15
3.3 Métodos	15
3.3.1 Processamento das amostras de tecido gástrico	15
3.3.2 Determinação das atividades enzimáticas	16
3.3.2.1 Determinação da atividade total da CK	16
3.3.2.2 Determinação da atividade total da LD	16
3.3.3 Determinação das atividades isoenzimáticas	16
3.3.3.1 Separação e quantificação das isoenzimas da CK	16
3.3.3.2 Determinação da atividade da fração isoenzimática "não-M" da CK	17

3.3.3.3 Separação e quantificação das isoenzimas da LD	17
3.3.4 Determinação das proteínas totais do tecido gástrico	17
3.3.5 Método estatístico	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
RESUMO	76

ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATP	Trifosfato de adenosina
ALP	Fosfatase alcalina
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CK	Creatina-quinase
BB	Fração isoenzimática 1 da creatina-quinase
MB	Fração isoenzimática 2 da creatina-quinase
MM	Fração isoenzimática 3 da creatina-quinase
CKB ₁	Sub-unidade B inativada da creatina-quinase
CK "não-M"	Fração isoenzimática da creatina-quinase resistente à inibição por anticorpos anti-CK M.
Macro CK-1	Creatina-quinase macromolecular, tipo 1
Macro CK-2	Creatina-quinase macromolecular, tipo 2
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgG	Imunoglobulina do tipo G
LD	Lactato-desidrogenase
LD ₁	Fração isoenzimática 1 da lactato-desidrogenase
LD ₂	Fração isoenzimática 2 da lactato-desidrogenase
LD ₃	Fração isoenzimática 3 da lactato-desidrogenase
LD ₄	Fração isoenzimática 4 da lactato-desidrogenase
LD ₅	Fração isoenzimática 5 da lactato-desidrogenase
LD ₆	Fração isoenzimática 6 da lactato-desidrogenase
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NSE	Enolase neuro-específica
U/G	Unidades por grama de proteínas do tecido

Observação: Estas abreviaturas serão convenientemente empregadas em toda a extensão do trabalho.

1. INTRODUÇÃO

As primeiras observações a respeito de alterações metabólicas em tecidos neoplásicos foram descritas por WARBURG¹¹² e datam de 1928. Este investigador constatou que havia maior grau de glicólise anaeróbica em células de origem tumoral, comprovado por aumento do teor de lactato.

Em 1954, GREENSTEIN³² verificou que células neoplásicas apresentavam padrões enzimáticos distintos daquele encontrado em células normais.

Estudos posteriores demonstraram que as células cancerosas podem apresentar distúrbios metabólicos, caracterizados por alterações de atividades enzimáticas e isoenzimáticas, devido às modificações na expressão ou regulação do genoma dessas células^{4,81}.

Na tentativa de elucidar o mecanismo da oncogênese, alguns investigadores estudaram as alterações enzimáticas em células obtidas de hepatomas induzidos experimentalmente. Esses estudos demonstraram que o tecido tumoral hepático pode produzir perfis enzimáticos e isoenzimáticos característicos e, sobretudo, semelhantes àqueles observados no fígado fetal^{4,23,88}. Essa característica da célula cancerosa hepática tem sido observada em outros tipos celulares neoplásicos e é, provavelmente, resultante de alterações na expressão dos genes durante o processo de divisão e diferenciação celulares^{4,26,32,76}.

Foi demonstrado que as alterações de atividades enzimáticas e isoenzimáticas nos diversos tecidos neoplásicos podem ter correlação com o crescimento tumoral e o grau histológico de maligni-

dade 33,56,92.

A partir das investigações realizadas por WARBURG ¹¹², ¹¹³, o estudo das enzimas em cancerologia foi intensificado. Inicialmente, estudaram-se as enzimas envolvidas na glicólise, tais como as isomerases, desidrogenases e transferases, e posteriormente, enzimas pertencentes a outras vias metabólicas.

A L-LACTATO: NAD-OXIDORREDUTASE - E.C. 1.1.1.27 (Lactato-desidrogenase, LD) é uma enzima chave no metabolismo glicídico e encontra-se largamente distribuída nos tecidos e fluidos biológicos do organismo. Essa enzima tem sido objeto de inúmeras investigações, nas quais se atribuem alterações de sua atividade a vários processos patológicos, tais como enfermidades cardíacas, musculares, hemolíticas, hepáticas, renais e neoplásicas ^{67,70,118,119}.

JURGA e Cols.⁴³ detectaram um aumento da atividade sérica da lactato-desidrogenase (LD) em pacientes com diferentes tipos de neoplasias, correlacionando-o com estados clínicos avançados. Essa alteração de atividade da LD tem sido atribuída a um aumento de síntese produzida pelo tumor, refletindo o grau de infiltração tecidual e a presença de nódulos metastáticos hepáticos ^{31,75,89,90}.

BOSL e cols.⁶ observaram elevação dos níveis séricos da LD em 62% dos pacientes com tumores testiculares.

PIRICK e cols.⁷⁹, estudando pacientes com tumores mamários e submetidas a mastectomia, constataram que os níveis elevados da LD sérica correlacionavam-se com a presença de metástases e com o aumento dos níveis séricos de antígeno carcino-embrionário (CEA) e de fosfatase alcalina (ALP).

Num estudo realizado em pacientes portadoras de neopla-

sias de ovário e útero, KIKUCHI e cols.⁵⁴ demonstraram elevação da atividade da LD total no soro de 53,1% das pacientes.

ARONEY e cols.³, estudando uma série de biomarcadores em carcinomas pulmonares, tais como CEA, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), enolase neuroespecífica (NSE) e LD, verificaram que os níveis desses marcadores apresentavam correlação significativa com o estágio da doença.

A atividade da LD pode estar elevada nos líquidos pleural e peritoneal em comparação com a atividade sérica, em pacientes portadores de tumores pulmonares^{7,89,118}.

No soro humano, podemos observar cinco formas isoenzimáticas da LD denominadas LD₁, LD₂, LD₃, LD₄ e LD₅ em função de suas mobilidades eletroforéticas^{37,70,77,119}. Cada isoenzima é composta por quatro sub-unidades que podem ser do tipo "H" ou "M" e cuja síntese é controlada por genes isolados. As cinco isoenzimas representam combinações desses monômeros: LD₁ (H₄), LD₂ (H₃M), LD₃ (H₂M₂), LD₄ (HM₃) e LD₅ (M₄). Cada sub-unidade confere ao tetrâmero propriedades catalíticas, físicas e imunológicas diferentes^{37,70,118}.

A composição isoenzimática da LD no soro pode apresentar alterações características em vários estados neoplásicos e frequentemente reflete o padrão presente no tecido neoplásico^{19,23,60,68,80}.

Muitos neoplasmas apresentam, predominantemente, um aumento da atividade da isoenzima LD₅. Essa característica tem sido acompanhada por uma elevada relação LD₅/LD₁ nos tecidos neoplásicos, so

bretudo quando comparada com aquelas de tecidos tumorais benignos ou tecidos normais do mesmo órgão 77,91,119. O aumento da atividade da LD₅ e da relação LD₅/LD₁ tem sido bem caracterizado em neoplasias do trato gastro-intestinal, genital e pulmonar 60,84,92, 101,117.

PROCHÁZKA e cols.⁸³, estudando o perfil isoenzimático da LD em mucosa gástrica normal e com gastrite, úlcera péptica ou carcinoma gástrico, constataram predominância das isoenzimas LD₄ e LD₅ em mucosa com gastrite, úlcera péptica e acentuadamente em carcinoma gástrico. Num estudo similar, MATE e cols.⁶⁹ observaram valores da LD₅ aumentados em tecido da margem de ressecção gástrica (peritumoral) e, notadamente, em tecido tumoral em relação ao tecido gástrico normal de indivíduos sadios.

Estudando padrões isoenzimáticos da LD em pacientes com adenocarcinoma de colon, CARDA-ABELLA e cols.¹² verificaram elevação da atividade da LD₅ nas mucosas de colon neoplásicas quando comparada com pólipos adenomatosos benignos e mucosa colônica normal.

Tem sido descrita uma isoenzima da LD que apresenta propriedades físico-químicas distintas das outras isoenzimas da LD conhecidas. Possui menor mobilidade eletroforética e maior estabilidade ao calor que a LD₅ e contém sub-unidade do tipo "M" em sua constituição química^{13,52}. Esta isoenzima foi denominada LD₆ e não se trata de um complexo entre a LD₅ e imunoglobulinas; contudo, pode representar um polímero ou agregado da LD₅. A LD₆ tem sido detectada no soro e em tecido hepático e muscular de pacientes hospitalizados em estado grave apresentado acidose, hipotensão e septicemia^{25,52,100}.

Paralelamente aos estudos da LD, outras enzimas tornaram-se objeto de investigação em oncologia. Aquelas que apresentaram correlação significativa com estados neoplásicos foram denominadas marcadores tumorais^{4,49,53,54,57,78,90,94,127}. Nos últimos vinte anos, a ATP:CREATINA-FOSFOTRANSFERASE-E.C. 2.7.3.2 (Creatina-quinase, CK) tem sido amplamente estudada no campo da cancerologia. Esta enzima está largamente distribuída no organismo humano. Encontra-se no citoplasma de células da maioria dos tecidos e, comprovadamente nas mitocôndrias das células do miocárdio, cérebro e fígado^{95,103,110}.

A creatina-quinase (CK) possui uma estrutura dimérica devido a associação de dois tipos de cadeias polipeptídicas distintas, "M" e "B", resultando nas isoenzimas BB (CK₁), MB (CK₂) e MM (CK₃)^{14,28,59,97,105,108}.

Os níveis de CK e a proporção relativa de suas formas isoenzimáticas modificam-se durante o desenvolvimento e diferenciação embrionários e mostram variação considerável de órgão para órgão^{21,42,59,103}.

A isoenzima CK MM encontra-se predominantemente no músculo esquelético, cujo teor representa aproximadamente 97% da atividade da CK total, enquanto a isoenzima CK MB predomina no músculo miocárdio com atividade de 30 a 40% da atividade da CK total. Já a CK BB tem sido demonstrada em uma grande variedade de órgãos, tais como, cérebro, tiróide, pulmão, estômago, intestino, baço, rim, bexiga urinária, próstata, útero e placenta^{21,28,31,42,50,95,96,105,110,115}.

O soro de indivíduos sadios apresenta maior proporção relativa de CK MM, de 94 a 98%, sendo que CK MB representa 5%. A CK

BB ocorre em quantidades mínimas, 0 a 1%, sendo dificilmente detectável pelos métodos usuais^{28,59,95,97,103}.

Muitos investigadores têm descrito alterações do padrão isoenzimático sérico da CK em vários estados neoplásicos^{16,17,24,28,38,41,62,101,107,108,111}.

A atividade da isoenzima CK MB apresentou-se elevada no soro de indivíduos que sofreram ressecção prostática e também em pacientes com carcinoma pulmonar^{30,55}.

A presença de atividade significativa da CK BB foi demonstrada por COOLEN e PRAGAY¹⁶, em 1976, no soro de pacientes portadores de carcinomas pulmonares. A isoenzima foi também constatada em homogenato de tumor primário, em algumas lesões metastáticas hepáticas e em gânglios linfáticos. Nesse mesmo ano, LEDERER e GERS-TREIN⁶² detectaram aumento da atividade sérica da CK BB em um paciente com adenocarcinoma gástrico metastático. A atividade da CK total estava normal e a CK BB correspondeu a 80% da atividade total.

HOAG e cols.³⁸, em 1978, realizaram um amplo estudo sobre o perfil isoenzimático sérico da CK em pacientes com diferentes tipos de neoplasias. Nesse estudo os autores verificaram que a atividade sérica da isoenzima CK BB apresentava-se elevada nos casos de adenocarcinoma gástrico, prostático e pulmonar, o que foi confirmado em outros estudos^{1,24,27,39,50,78,94,127}. No ano seguinte, ZWEIG e cols.¹²⁶ realizaram um estudo semelhante empregando um método de radioimunoensaio para a detecção de CK BB. Os níveis séricos da isoenzima correlacionaram-se com o estágio da doença e com a evolução de processos metastáticos.

Estudando pacientes com adenocarcinomas gástricos, BURLI-NA e cols.⁸ observaram aumento na atividade sérica da CK BB, o que não ocorreu em pacientes com displasias de estômago.

Recentemente, BURNAM e SHELL⁹ propuseram uma modificação no método de determinação da CK BB por radioimunoensaio, utilizando o monômero B inativado para produzir o anticorpo anti-CK B₁. Utilizando esse método, BURNAM e cols.¹⁰, demonstraram aumento significativo nos níveis séricos de CK B₁ em pacientes com adenocarcinoma gástrico, pulmonar, prostático e colorretal.

Alguns autores têm descrito formas variantes da CK que apresentam propriedades físico-químicas e imunológicas distintas das três isoenzimas comumente detectáveis. Essas formas atípicas, denominadas macro CK devido ao seu elevado peso molecular, parecem estar associadas a neoplasias amplamente disseminadas e, em geral, estão presentes no plasma de pacientes em estado grave^{33,49,58,64,72,74,97,120,121}.

A primeira forma de CK macromolecular evidenciada, apresentando mobilidade eletroforética entre CK MB e CK MM, foi denominada macro CK, tipo 1 (macro CK-1) e resulta da associação da isoenzima CK BB com imunoglobulinas^{5,20,59,65,66,71,98,109,114,123}.

Frequentemente essa forma atípica contém CK BB como componente isoenzimático e, eventualmente, têm sido demonstrados complexos CK MM-Imunoglobulinas^{28,44,45,82,124}. A imunoglobulina presente nessa macro CK comumente é do tipo Ig G e, raramente, tem sido observada a do tipo Ig A^{45,121,124}.

Outra forma atípica da CK, a macro CK, tipo 2 (macro CK-2) é de origem mitocondrial e não se comporta como um complexo entre isoenzima da CK e imunoglobulinas^{20,28,36,40,47,48,51,65,120,121}.

A macro CK-2 pode ocorrer na forma dimérica, com massa molecular semelhante à das isoenzimas citoplasmáticas (CK MM, CK MB e CK BB), de aproximadamente 80.000 daltons, ou na forma de agregados oligoméricos de elevada massa molecular com aproximadamente 350.000 daltons. Apresenta, também, maior energia de ativação que a macro CK-1 e que as isoenzimas citoplasmáticas^{46,59,98}.

Essas formas atípicas da CK têm ocorrido em pacientes com diversas patologias graves e, sobretudo, com neoplasias^{44,47,48, 49, 63,68,72,87,101,107,121,123,124}.

KANEMITSU e cols.⁴⁵ demonstraram a macro CK-1 (complexo CK-Ig G e complexo CK-Ig A/Beta-lipoproteína) e a macro CK-2 no soro de um paciente com carcinoma de colon no estágio terminal.

A macro CK-2 foi observada no soro de um paciente com carcinoma gástrico que apresentou coagulação intravascular disseminada⁷³.

KOVEN e cols.⁵⁷ encontraram a macro CK-2 no soro de pacientes com neoplasias gastro-intestinais o que não ocorreu nos que apresentavam outros tipos de patologias.

Estudando pacientes hospitalizados, STEIN e cols.⁹⁹ constataram a presença da macro CK-2 no soro de indivíduos com tumores malignos e cirrose hepática. Em alguns casos houve regressão da doença e desaparecimento da CK atípica sérica. Num estudo similar, GROBBEL e cols.³⁴ detectaram essa macro CK em pacientes portadores de tumores de colon, fígado, próstata, pulmão e mama.

Como podemos observar, o estudo dos padrões enzimáticos e isoenzimáticos dos tecidos neoplásicos, particularmente naqueles do trato gastro-intestinal, tem possibilitado a caracterização de alterações metabólicas nesses tecidos.

2. PROPOSIÇÃO

O estudo dos perfis enzimático e isoenzimático séricos, em indivíduos com vários tipos de neoplasias, tem permitido estabelecer correlações entre as atividades enzimáticas nos tecidos neoplásicos e aquelas presentes na corrente circulatória.

Com a finalidade de contribuir para a caracterização e monitoração das neoplasias gástricas, realizamos estudos sobre as atividades enzimáticas e isoenzimáticas da creatina-quinase (CK) e da lactato-desidrogenase (LD) no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico, submetidos a tratamento cirúrgico, correlacionando-as com as respectivas atividades nos tecidos gástricos neoplásico e da margem de ressecção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Grupo de estudo:

O grupo de estudo foi constituído por 7 homens e 6 mulheres, com idade de 34 a 75 anos, portadores de adenocarcinoma gástrico, internados no Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente e submetidos a tratamento cirúrgico. O diagnóstico de cada paciente foi realizado mediante exame clínico, radiológico, ultrassonográfico, endoscópico e histopatológico. Os dados individuais dos pacientes encontram-se relacionados nos quadros I e II.

Durante o período da hospitalização, colheram-se amostras de sangue dos pacientes, antes e após a ressecção gástrica, conforme o esquema a seguir:

- . 1ª amostra: 24 hs. antes da cirurgia (pré-operatório)
- . 2ª amostra: 24 hs. após a cirurgia (1º pós-operatório)
- . 3ª amostra: 48 hs. após a cirurgia (2º pós-operatório)
- . 4ª amostra: 96 hs. após a cirurgia (4º pós-operatório)
- . 5ª amostra: 144 hs. após a cirurgia (6º pós-operatório)

Obtiveram-se, também, amostras do tecido gástrico neoplásico e da margem de ressecção.

3.1.2 Grupo controle:

Para avaliar as alterações de atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase e lactato-desidrogenase do pré-operatório consideramos, como grupo controle, os valores de referência observados na literatura^{2,29,70,95,102,122}.

Quadro I: Dados clínicos dos indivíduos que constituíram o grupo de estudo.

Nº amostra	Paciente	Idade (anos)	Sexo	Estágio clínico	Classificação T.M.N.*
1	S.D.A.	75	Feminino	I	$T_2N_0M_0$
2	B.P.	69	Feminino	I	$T_2N_0M_0$
3	R.F.S.	50	Masculino	II	$T_3N_0M_0$
4	T.T.G.	55	Feminino	III	$T_3N_1M_0$
5	M.M.M.	66	Feminino	III	$T_3N_1M_0$
6	J.F.B.	69	Masculino	III	$T_3N_1M_0$
7	J.C.O.	34	Masculino	III	$T_3N_2M_0$
8	E.C.M.M.	62	Feminino	III	$T_3N_1M_0$
9	J.V.C.	67	Masculino	III	$T_3N_2M_0$
10	R.B.B.	67	Feminino	III	$T_3N_2M_0$
11	C.J.S.	60	Feminino	III	$T_3N_2M_0$
12	S.B.	63	Masculino	III	$T_3N_2M_0$
13	B.G.S.	72	Masculino	IV	$T_3N_2M_1^{**}$

* Classificação de neoplasias proposta pela "UNION INTERNATIONALE CONTRE LE CANCER (UICC)"¹⁵.

**Presença de metástase em esôfago.

Quadro II: Dados relativos ao diagnóstico histopatológico e ao tamanho do tumor dos indivíduos estudados.

Nº amostra	Diagnóstico histopatológico	Tamanho do tumor (cm)
Adenocarcinoma tubular		
1	. bem diferenciado	4,0 x 4,0 x 2,5
2	. bem diferenciado	6,0 x 3,0 x 2,5
3	. moderadamente diferenciado	15,0 x 12,0 x 5,0
4	. moderadamente diferenciado	11,0 x 5,0 x 4,3
5	. moderadamente diferenciado	8,0 x 6,0 x 4,0
6	. moderadamente diferenciado	6,0 x 3,0 x 2,0
7	. moderadamente diferenciado	9,0 x 5,0 x 2,0
8	. pouco diferenciado	4,0 x 2,5 x 1,5
9	. pouco diferenciado	9,0 x 6,0 x 0,5
10	. pouco diferenciado	6,0 x 4,0 x 2,0
11	. pouco diferenciado	5,0 x 4,0 x 3,5
12	. pouco diferenciado	5,0 x 4,0 x 3,0
13	Adenocarcinoma mucossecrator	7,0 x 6,0 x 3,0

3.2 Colheita dos materiais

3.2.1. Amostras de sangue:

Essas amostras foram colhidas por punção venosa, sem uso de anticoagulante, centrifugadas, e os soros obtidos foram analisados até 3 horas após a colheita.

3.2.2 Amostras de tecido gástrico:

As amostras de tecido gástrico neoplásico e da margem de ressecção foram obtidas durante a gastrectomia e divididas em três fragmentos, dos quais, dois foram submetidos ao exame histopatológico e o restante foi imediatamente refrigerado e processado segundo o método descrito no item 3.3.1.

3.3 Métodos

3.3.1 Processamento das amostras de tecido gástrico:

- 1) 0,5 g de tecido gástrico foram homogeneizados em uma solução de sacarose 0,25 M, por 30 minutos, em banho de gelo. Para tal, utilizou-se um homogeneizador tipo NSE-11R (Potter-Elvehjyn) da A. H. Thomas, C.O. (E.U.A.).
- 2) Os homogenatos foram centrifugados a 3000 rpm, por 15 minutos, à temperatura de 4°C.
- 3) No sobrenadante foram determinadas as atividades enzimáticas totais e isoenzimáticas da CK e da LD e o teor de proteínas totais.

3.3.2 Determinação das atividades enzimáticas:

3.3.2.1 Determinação da atividade total da CK:

Para a determinação da atividade enzimática total da CK no soro e no homogenato de tecido gástrico empregamos um método otimizado segundo recomendações da Sociedade Alemã de Química Clínica²⁹. Foi utilizado "Kit" comercial da Merck S.A., Divisão Diagnóstica, Darmstadt (F.D.R.).

A faixa de valores de referência, no soro, por este método oscila entre 10 e 80 U/L no homem e 10 e 70 U/L na mulher, à 25°C.

3.3.2.2 Determinação da atividade total da LD:

A atividade enzimática total da LD no soro e no homogenato de tecido gástrico foi determinada por meio de um método preconizado por AMADOR e cols.².

A faixa de valores de referência, no soro, por este método oscila entre 41 e 99 U/L, a 25°C.

3.3.3 Determinação das atividades isoenzimáticas:

3.3.3.1 Separação e quantificação das isoenzimas da CK:

As isoenzimas da CK foram separadas por eletroforese em acetato de celulose e quantificadas por densitometria na região do ultravioleta, conforme o procedimento descrito por STRUFALDI¹⁰².

A faixa de valores de referência, no soro, para cada isoenzima é a seguinte:

CK MM : 9 a 78 U/L

CK MB : 1 a 6 U/L

CK BB : 0 a 1 U/L

3.3.3.2 Determinação da atividade da fração isoenzimática "não-M" da CK:

Utilizou-se um método imuno-químico pelo qual se determina a atividade residual da CK, após a inibição da sub-unidade CK-M por anticorpos específicos¹²². Para isso, empregamos "Kit" comercial da Merck S.A., Divisão Diagnóstica, Darmstadt (F.D.R.).

A faixa de valores de referência, no soro, por este método oscila entre 0,5 e 5 U/L, a 25°C.

3.3.3.3. Separação e quantificação das isoenzimas da LD:

A separação das isoenzimas da LD foi realizada por eletroforese em acetato de celulose e a quantificação por densitometria, conforme a técnica descrita por STRUFALDI¹⁰².

A faixa de valores de referência, no soro, para cada isoenzima é de:

LD₁ : 7 a 23 U/L

LD₂ : 13 a 36 U/L

LD₃ : 9 a 24 U/L

LD₄ : 4 a 13 U/L

LD₅ : 3 a 13 U/L

3.3.4 Determinação das proteínas totais do tecido gástrico:

Para a determinação das proteínas totais dos homogenatos de tecido gástrico utilizamos o método preconizado por RICE⁸⁵.

3.3.5 Método estatístico:

Para o estudo estatístico dos resultados obtidos utilizamos a prova de Walsh⁹³, a prova da Friedman⁹³ e o coeficiente de correlação de Pearson¹⁸.

4. RESULTADOS

Os dados relativos às atividades enzimáticas e isoenzimáticas da CK nos homogenatos de tecido gástrico neoplásico estão expostos na tabela I. Pode-se observar a predominância da isoenzima CK BB (8 a 915 U/g) e a presença de formas variantes da CK. A macro CK-1, com mobilidade eletroforética entre CK MB e CK MM, foi detectada em dois homogenatos e a macro CK-2, mais catódica que a CK MM, foi observada em onze homogenatos (Figura 1). Em quatro homogenatos foi encontrada atividade de CK "não-M" superior à atividade total da CK.

Conforme os dados da tabela II, a isoenzima predominante nos homogenatos de tecido gástrico da margem de ressecção também foi a CK BB (56 a 1177 U/g). Nestes homogenatos observou-se apenas a macro CK-2 como forma atípica da CK (Figura 1).

A prova estatística de Walsh⁹³, aplicada aos dados das tabelas I e II, demonstrou que as atividades enzimáticas da CK total, CK "não-M", CK BB, CK MB, CK MM e macro CK-2 dos homogenatos de tecido gástrico da margem de ressecção foram significativamente superiores às aquelas observadas nos homogenatos de tecido neoplásico, enquanto os índices CKBB/CK total foram inferiores (Tabela XV).

Na tabela XVII, apresentamos os coeficientes de correlação de Pearson¹⁸ entre o tamanho tumoral e as atividades enzimáticas e isoenzimáticas da CK nos homogenatos do tecido gástrico neoplásico e da margem de ressecção. Houve correlação negativa entre o tamanho dos tumores e os índices CKBB/CK total nos dois tipos de homogenatos estudados.

Os valores das atividades séricas da CK do pré-operatório (24 horas antes da gastrectomia) estão expostos na tabela III. A

Tabela I: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da creatina-quinase nos homogenatos de tecido gástrico neoplásico.

Nº amostra	Atividade da CK*		Isoenzimas da CK*				mCK ₂	Índice CKBB/CK total	Proteínas (g/L)
	Total	"não-M"	BB	MB	MM	mCK ₁			
1	108	101	79	19	7	-	3	0,73	11,0
2	103	112	62	22	13	-	6	0,60	4,4
3	144	90	28	40	49	-	27	0,19	4,6
4	68	61	8	48	12	-	-	0,12	6,1
5	414	426	286	37	83	-	8	0,69	4,2
6	251	246	198	15	25	-	13	0,79	5,6
7	413	358	173	62	128	-	50	0,42	5,0
8	60	59	30	4	6	-	20	0,50	11,7
9	178	178	135	21	13	-	9	0,76	5,6
10	1077	1094	915	97	65	-	-	0,85	7,5
11	297	326	187	41	30	21	18	0,63	5,8
12	119	115	44	33	20	12	10	0,37	3,8
13	185	150	111	26	33	-	15	0,60	4,8

* Atividade expressa em Unidades por grama de proteínas do tecido (U/g)

Tabela II: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da creatina-quinase nos homogenatos de tecido gástrico da margem de ressecção.

Nº amostra	Atividade da CK*		Isoenzimas da CK*					Índice CKBB/CK total	Proteínas (g/L)
	Total	"não-M"	BB	MB	MM	mCK ₁	mCK ₂		
3	513	293	56	159	185	-	113	0,11	5,6
5	777	674	451	155	148	-	23	0,58	3,6
6	717	702	444	79	72	-	122	0,62	11,4
7	1680	1320	689	571	235	-	147	0,41	6,1
9	1635	1595	1177	196	115	-	147	0,72	4,1
13	379	328	223	61	61	-	34	0,59	5,8

* Atividade expressa em Unidades por grama de proteínas do tecido (U/g)

Figura 1 : Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da creatina-quinase nos homogenatos de tecido gástrico.

tividade da CK total apresentou-se elevada em 2 dos 13 indivíduos estudados (15%), a CK "não-M" em 4 (31%), a CK BB em 13 (100%), a CK MB em 9 (69%) e a CK MM em 2 (15%).

Houve correlação positiva das atividades séricas da CK total e CK do pré-operatório com as atividades dos homogenatos da margem de ressecção, não havendo correlação com as atividades enzimáticas do tecido neoplásico (Tabela XVIII).

Verificamos, também, que o tamanho do tumor não se correlacionou com as atividades séricas da CK do pré-operatório. Entretanto, houve correlação positiva com o índice CKBB/CK total (Tabela XIX).

Foram determinadas as atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da CK nos períodos de 24, 48, 96 e 144 horas após a gastrectomia, com a finalidade de avaliar o efeito da ressecção gástrica sobre as atividades séricas do pré-operatório (Tabela IV, V, VI, e VII). Podemos observar um aumento das atividades enzimáticas séricas no 1º período pós-operatório (24 horas após a gastrectomia) e diminuição gradativa nos outros períodos estudados (Figuras 2 e 3).

No 6º período pós-operatório (144 horas após a gastrectomia), a atividade da CK total estava elevada em 2 dos 13 indivíduos estudados (15%), a CK "não-M" em 3 (23%), a CK BB em 9 (69%), a CK MB em 6 (46%) e a CK MM em 9 (69%) com relação ao pré-operatório (Tabela VII).

Pela prova estatística de Friedman⁹³, as diferenças entre as atividades enzimáticas séricas do pré-operatório e de cada período pós-operatório foram significantes para CK total, CK "não-M", CK BB, CK MB e CK MM (Tabela XVI). Essas diferenças foram mais significativas para CK total e CK MM como se pode observar nas figuras 2 e 3.

Tabela III: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase, 24 horas antes da gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da CK*		Isoenzimas da CK*			Índice CKBB/CKtotal
	Total	"não-M"	BB	MB	MM	
1	15	3	5	5	5	0,36
2	10	2	4	2	4	0,40
3	41	5	24	10	7	0,58
4	12	4	3	7	2	0,25
5	12	2	5	4	3	0,42
6	16	6	5	8	3	0,34
7	62	4	12	40	10	0,20
8	33	4	9	11	13	0,27
9	138	12	26	26	86	0,19
10	22	4	6	10	6	0,28
11	124	6	16	14	94	0,13
12	41	6	9	14	18	0,21
13	10	2	3	4	3	0,30

* Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabelas IV: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase, 24 horas após a gastrotectomia.

Nº amostra	Atividade da CK*		Isoenzimas da CK*		
	Total	"não-M"	BB	MB	MM
1	126	6	16	10	100
2	103	4	2	4	97
3	640	16	205	115	320
4	310	12	50	173	87
5	148	8	15	13	120
6	252	6	30	53	169
7	792	21	48	95	649
8	186	8	24	21	141
9	3673	82	147	330	3196
10	355	12	39	53	263
11	227	8	16	7	204
12	136	12	38	29	69
13	202	8	20	40	142

* Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabela V: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase, 48 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da CK*		Isoenzimas da CK*		
	Total	"não-M"	BB	MB	MM
1	59	4	18	17	24
2	55	5	16	8	31
3	289	9	52	23	214
4	169	7	34	84	51
5	87	4	21	4	62
6	148	8	30	43	75
7	542	12	11	16	515
8	76	6	14	17	45
9	2373	206	119	119	2135
10	128	8	15	23	90
11	120	4	14	25	81
12	42	4	11	13	18
13	95	6	8	10	77

*Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabela VI: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase, 96 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da CK* Total	"não-M"	Isoenzimas da CK*		
			BB	MB	MM
1	30	4	10	10	10
2	12	4	4	4	4
3	198	8	69	32	97
4	72	7	21	28	23
5	18	2	7	6	5
6	81	4	8	5	68
7	689	19	41	83	565
8	26	4	4	8	14
9	392	16	35	35	322
10	29	4	4	10	15
11	62	8	9	13	40
12	54	4	14	18	22
13	48	4	8	15	25

* Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabelas VII: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase, 144 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da CK*		Isoenzimas da CK*		
	Total	"não-M"	BB	MB	MM
1	17	3	7	6	4
2	12	2	6	1	5
3	62	8	17	15	30
4	33	4	12	8	13
5	12	4	5	3	4
6	40	4	4	4	32
7	443	12	22	27	394
8	21	4	5	7	9
9	260	15	34	39	187
10	18	4	10	4	4
11	29	4	11	11	7
12	52	4	10	21	21
13	33	2	5	7	21

* Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Figura 2 : Valores das atividades enzimáticas séricas da CK Total e da CK "não-M" nos períodos de estudo.

Horas antes e após a gastrectomia

Horas antes e após a gastrectomia

Horas antes e após a gastrectomia

Figura 3 : Valores das atividades enzimáticas séricas da CK BB, CK MB e CK MM nos períodos de estudo.

Os resultados referentes às atividades enzimáticas e isoenzimáticas da LD nos homogenatos dos tecidos gástricos neoplásico e da margem de ressecção constam nas tabelas VIII e IX (Figura 4).

As atividades da LD total e isoenzimas LD_1 , LD_2 , LD_3 e LD_4 nos homogenatos dos tecidos estudados não apresentaram diferenças significativas pela prova de Walsh⁹³ (Tabela XV). Contudo, as atividades da LD_5 e os índices LD_5/LD_1 foram significativamente superiores nos homogenatos do tecido gástrico neoplásico.

Os valores das atividades da LD total, LD_2 , LD_3 e LD_4 do tecido gástrico neoplásico se correlacionaram positivamente com o tamanho do tumor (Tabela XVII). O tamanho tumoral não se correlacionou com as atividades enzimáticas e isoenzimáticas da LD no tecido da margem de ressecção.

Podemos observar que as atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da LD, no pré-operatório, apresentaram-se dentro dos valores de referência (Tabela X).

As atividades séricas da LD_2 e LD_3 se correlacionaram positivamente com as atividades das mesmas isoenzimas dos tecidos neoplásicos e apenas a LD_3 sérica correlacionou-se com a atividade do tecido da margem de ressecção (Tabela XVIII).

Pela tabela XIX, verificamos que as atividades enzimáticas séricas da LD total e LD_3 , no pré-operatório, apresentaram correlação positiva com o tamanho do tumor.

Os valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da LD, nos períodos pós-operatórios, constam nas tabelas XI, XII, XIII e XIV. Esses dados demonstram que houve aumento das atividades enzimáticas no 1º pós-operatório (24 horas após a gastrectomia) em relação ao pré-operatório e diminuição gradativa nos demais períodos estudados (Figuras 5 e 6).

Tabela VIII: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da lactato-desidrogenase nos homogenatos de tecido gástrico neoplásico.

Nº amostra	Atividade total da LD*	Isoenzimas da LD*					Índice LD ₅ /LD ₁	Proteínas (g/L)
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅		
1	45	7	8	4	8	18	2,6	11,0
2	340	34	58	31	112	105	3,1	4,4
3	580	75	99	87	220	99	1,3	4,6
4	490	59	118	39	78	196	3,3	6,1
5	210	42	42	13	54	59	1,4	4,2
6	158	27	25	19	43	44	1,6	5,6
7	220	46	48	20	44	62	1,3	5,0
8	114	22	25	6	36	25	1,1	11,7
9	215	26	45	30	58	56	2,2	5,6
10	160	16	40	18	51	35	2,2	7,5
11	231	37	35	23	64	72	1,9	5,8
12	190	30	34	27	46	53	1,8	3,8
13	195	25	31	22	68	49	2,0	4,8

* Atividade expressa em Unidades por grama de proteínas do tecido (U/g)

Tabela IX: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da lactato-desidrogenase nos homogenatos de tecido gástrico da margem de ressecção.

Nº amostra	Atividade total da LD*	Isoenzimas da LD*					Índice LD ₅ /LD ₁	Proteínas (g/L)
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅		
3	223	51	45	40	56	31	0,6	5,6
5	176	56	53	18	42	7	0,1	3,6
6	111	16	22	22	29	22	1,4	11,4
7	180	54	41	11	27	47	0,9	6,1
9	265	50	66	35	77	37	0,7	4,1
13	86	21	18	4	25	18	0,8	5,8

* Atividade expressa em Unidades por grama de proteínas do tecido (U/g)

At. enz.
(U/g pt.)

Tecido gástrico neoplásico

At. enz.
(U/g pt.)

Tecido da margem de ressecção

Figura 4: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da lactato-desidrogenase nos homogenatos de tecido gástrico.

A prova de Friedman⁹³ demonstrou que houve diferenças significativas entre as atividades enzimáticas séricas da LD total, LD₂, LD₃ e LD₄ no pré-operatório em relação às aquelas de cada período pós-operatório, sendo que essas diferenças foram mais significantes para a LD total (Tabela XVI).

Tabela X: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da lactato-desidrogenase, 24 horas antes da gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da LD* Total	Isoenzimas da LD*					Índice LD ₅ /LD ₁
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅	
1	54	7	9	15	13	10	1,43
2	42	9	12	10	7	4	0,44
3	75	21	20	19	10	5	0,24
4	52	12	16	13	8	3	0,25
5	40	11	10	10	5	4	0,36
6	43	15	10	9	5	4	0,27
7	57	16	19	11	7	4	0,25
8	45	16	14	7	4	4	0,25
9	60	16	18	13	7	6	0,38
10	70	16	19	17	10	8	0,50
11	30	6	8	7	5	4	0,67
12	50	17	13	10	6	4	0,24
13	41	20	13	4	2	2	0,10

* Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabela XI: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da lactato-desidrogenase, 24 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da LD* Total	Isoenzimas da LD*				
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅
1	84	12	19	18	15	20
2	70	16	21	17	9	7
3	110	28	28	20	16	18
4	90	26	22	15	13	14
5	95	29	29	22	8	7
6	70	25	23	15	3	4
7	120	30	29	25	16	20
8	66	16	20	14	10	6
9	399	88	83	76	80	72
10	297	74	80	65	48	30
11	90	29	24	19	10	8
12	60	24	20	10	3	3
13	93	24	25	19	14	11

*Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabela XII: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da lactato-desidrogenase, 48 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da LD*	Isoenzimas da LD*				
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅
1	65	9	18	14	11	13
2	65	21	23	12	5	4
3	100	31	29	17	12	11
4	75	14	21	17	16	7
5	65	26	25	11	1	2
6	83	26	32	18	5	2
7	91	18	29	17	11	16
8	65	16	17	15	9	8
9	260	86	70	52	16	36
10	261	60	78	63	29	31
11	55	17	18	14	4	2
12	59	11	16	14	12	2
13	57	16	16	12	5	8

*Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabela XIII: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da lactato-desidrogenase, 96 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da LD* Total	Isoenzimas da LD*				
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅
1	56	20	17	8	6	5
2	50	8	11	12	10	9
3	108	37	37	19	10	5
4	65	25	23	10	6	1
5	55	19	19	11	3	3
6	48	22	13	6	3	4
7	121	40	39	30	5	7
8	85	31	23	14	5	12
9	112	30	32	35	14	11
10	70	21	24	14	7	4
11	75	22	22	17	8	6
12	56	12	20	14	6	4
13	48	21	19	6	1	1

*Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Tabela XIV: Valores das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da lactato-desidrogenase, 144 horas após a gastrectomia.

Nº amostra	Atividade da LD* Total	Isoenzimas da LD*				
		LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD ₅
1	56	14	16	13	7	6
2	45	11	15	8	5	6
3	65	22	20	9	6	8
4	80	22	19	16	10	13
5	70	15	19	17	12	7
6	56	14	16	12	7	7
7	111	20	26	24	22	19
8	70	26	17	12	7	8
9	168	59	55	28	12	14
10	65	21	25	10	3	5
11	50	10	15	12	8	5
12	54	16	17	9	7	5
13	52	21	14	7	5	5

*Atividade expressa em Unidades por litro (U/L).

Horas antes e após a gastrectomia

Horas antes e após a gastrectomia

Horas antes e após a gastrectomia

Figura 5: Valores das atividades enzimáticas séricas da LD total, LD₁ e LD₂ nos períodos de estudo.

Horas antes e após a gastrectomia

Horas antes e após a gastrectomia

Horas antes e após a gastrectomia

Figura 6: Valores das atividades enzimáticas séricas da LD₃, LD₄ e LD₅ nos períodos de estudo

Tabela XV: Comparação das atividades enzimáticas e isoenzimáticas da creatina-quinase e da lactato-desidrogenase do tecido da margem de ressecção com aquelas do tecido neoplásico (Prova de Walsh⁹³).

Enzimas	Média das diferenças (n=6)
CK total	686*
CK "não-M"	577*
CK BB	348*
CK MB	170*
CK MM	81*
macro CK-2	84*
Índice CKBB/CKtotal	- 0,07*
LD total	- 90
LD ₁	1
LD ₂	- 8
LD ₃	- 10
LD ₄	- 38
LD ₅	- 34*
Índice LD ₅ /LD ₁	- 0,90*

*Diferenças significantes para $p < 0,05$.

n = número de amostras

Tabela XVI: Comparação das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase e da lactato - desidrogenase do período pré-operatório com os demais períodos. (Prova de Friedman⁹³).

Enzimas	Valores de χ^2_r
CK total	35,30*
CK "não-M"	21,68*
CK BB	25,00*
CK MB	19,83*
CK MM	34,80*
LD total	19,07*
LD ₁	7,56
LD ₂	15,19*
LD ₃	15,74*
LD ₄	8,35*
LD ₅	7,06

* Valores significantes para $p < 0,05$.

Tabela XVII: Coeficiente de correlação de Pearson¹⁸ entre o tamanho do tumor e as atividades enzimáticas e isoenzimáticas da creatina-quinase e da lactato-desidrogenase dos tecidos gástricos.

Atividades enzimáticas nos homogenatos (y) U/g	Tamanho do tumor (x) cm	
	Tecido neoplásico (n=13)	Tecido da margem de ressecção (n=6)
CK Total	- 0,14	- 0,45
CK "não-M"	- 0,19	- 0,56
CK BB	- 0,21	- 0,64
CK MB	0,12	- 0,12
CK MM	0,17	0,38
macro CK-2	0,25	- 0,07
Índice CKBB/CKtotal	- 0,60*	- 0,90**
LD Total	0,79*	0,31
LD ₁	0,80*	0,31
LD ₂	0,66*	0,11
LD ₃	0,90*	0,56
LD ₄	0,89*	0,25
LD ₅	0,39	0,02
Índice LD ₅ /LD ₁	- 0,22	- 0,31

* $r = 0,48$

(x) = variável x

** $r = 0,73$

(y) = variável y

($p < 0,05$)

n = número de amostras

Tabela XVIII: Coeficiente de correlação de Pearson¹⁸ entre as atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase e da lactato-desidrogenase no pré-operatório e aquelas dos tecidos gástricos.

Atividades enzimáticas nos homogenatos (y) U/g	Atividades enzimáticas séricas no pré-operatório (x) U/L	
	Tecido neoplásico (n=13)	Tecido da margem de ressecção(n=6)
CK Total	- 0,02	0,79**
CK "não-M"	- 0,07	0,53
CK BB	- 0,15	0,37
CK MB	0,26	0,90**
CK MM	- 0,19	- 0,08
Índice CKBB/CKtotal	- 0,15	- 0,67
LD Total	0,34	0,72
LD ₁	0,25	- 0,25
LD ₂	0,53*	0,42
LD ₃	0,50*	0,88**
LD ₄	0,14	0,57
LD ₅	- 0,43	0,44
Índice LD ₅ /LD ₁	0,31	- 0,31

* r = 0,48

(x) = variável x

** r = 0,73

(y) = variável y

(p < 0,05)

n = número de amostras

Tabela XIX: Coeficiente de correlação de Pearson¹⁸ entre o tamanho do tumor e as atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da creatina-quinase e lactato-desidronenase no período pré-operatório.

Atividades enzimáticas no pré-operatório (y) U/L	Tamanho do tumor (x) cm
	n = 13
CK Total	- 0,09
CK "não-M"	- 0,06
CK BB	0,44
CK MB	- 0,14
CK MM	- 0,18
Índice CKBB/CKtotal	0,69*
LD Total	0,52*
LD ₁	0,42
LD ₂	0,43
LD ₃	0,53*
LD ₄	0,28
LD ₅	- 0,09
Índice LD ₅ /LD ₁	- 0,23

* r = 0,48

(p < 0,05)

(x) = variável x

(y) = variável y

n = número de amostras

5. DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, verificamos que os tecidos com adenocarcinoma gástrico apresentaram atividades enzimáticas da CK e da LD, bem como de suas isoenzimas, diferentes daquelas observadas nos tecidos da margem de ressecção correspondente.

De fato, os tecidos neoplásicos apresentam características morfológicas, funcionais e, sobretudo, metabólicas distintas dos tecidos normais no mesmo órgão. Estruturalmente, as células tumorais possuem poucas mitocôndrias, retículo endoplasmático reduzido, membrana irregular e alterações do citoesqueleto. Esse padrão morfológico frequentemente é acompanhado por deleção de enzimas ou de vias metabólicas especializadas, o que torna essas células funcionalmente mais simples. Segundo alguns autores, essas características se desenvolvem durante o processo de transformação neoplásica^{15,33,35,86,92}.

Em nosso estudo, verificamos que os tecidos gástricos neoplásicos apresentaram atividades enzimáticas e isoenzimáticas da CK inferiores às observadas nos tecidos da margem de ressecção correspondente. Esse fato parece estar associado a alterações de atividades enzimáticas que acompanham a transformação neoplásica. Contudo, a menor atividade enzimática da CK no tecido tumoral gástrico também pode estar relacionada com a presença de áreas necróticas resultantes de diminuição na vascularização intra-tumoral durante o processo de desenvolvimento do neoplasma^{15,86}.

Os perfis isoenzimáticos da CK nos tecidos gástricos neoplásicos e da margem de ressecção revelaram a predominância da isoenzima CK BB, o que tem sido observado em outros estudos^{50,105,107}.

Quando analisamos o teor percentual dessa isoenzima, expresso pelo índice CKBB/CKtotal, verificamos que foi significativamente maior no tecido gástrico neoplásico.

Vários investigadores têm demonstrado que os tecidos tumorais de vários órgãos, sobretudo aqueles do trato gastro-intestinal, apresentam quantidades significativas de CK BB ⁵⁵, 107,108,111. Esse fato tem sido atribuído a uma expressão oncofetal dessa isoenzima, considerando que os genomas responsáveis por padrões bioquímicos fetais podem ser desreprimidos durante a transformação neoplásica ^{26,33,76,88,92}.

A atividade da CK "não-M" apresentou-se superior à atividade da CK Total em quatro homogenatos de tecidos gástrico neoplásico, o que possivelmente está relacionado com a presença da isoenzima CK BB e das formas variantes da CK, macro CK-1 e macro CK-2, como também tem sido observado em outros estudos ^{35,97,110,120}.

O perfil isoenzimático da CK nos tecidos gástricos neoplásicos parece sofrer influência do tamanho tumoral, o que pode ser observado pela correlação negativa entre o tamanho do tumor e o índice CKBB/CKtotal desses tecidos. De fato, o supercrescimento da massa tumoral pode diminuir o suprimento sanguíneo no seu interior e, com isso, desenvolvem-se áreas necróticas responsáveis pela liberação de quantidades significativas de enzimas e outros componentes intra-celulares para o sistema vascular ^{1,4,15,86}. Esse aporte de enzimas para a corrente circulatória pode ser notado pela correlação positiva entre o tamanho tumoral e o índice CKBB/CKtotal no soro.

O aumento da atividade enzimática sérica da CK BB dos pacientes estudados, no pré-operatório, pode ser atribuída à liberação intratumoral, contudo pode resultar também da ação de processos

invasivos do adenocarcinoma gástrico sobre o tecido normal adjacente, considerando que os tecidos gástricos neoplásicos e da margem de ressecção possuem quantidades significativas dessa isoenzima. Esses mecanismos de liberação da CK BB pelos neoplasmas tem sido referidos por vários autores ^{1,4,17,104,106}.

Já o aumento da atividade sérica da CK MB, no pré-operatório, pode decorrer de uma liberação peritumoral, por ação de processos invasivos tumorais, considerando que a atividade dessa isoenzima na margem de ressecção gástrica apresentou relação positiva com a atividade sérica. Por outro lado, essa alteração pode resultar também da reação da hibridização entre as isoenzimas CK MM e CK BB, descrita por LANG e WURZBURG ⁵⁹ e que pode ocorrer "in vivo" ou "in vitro".

Após a gastrectomia observamos o aumento significativo das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da CK, notadamente no 1º período pós-operatório. A predominância da atividade sérica da CK MM nos períodos pós-cirúrgicos, provavelmente corresponde a liberação dessa isoenzima pelo tecido muscular esquelético lesado durante a intervenção cirúrgica, considerando que a CK MM desse tecido corresponde a, aproximadamente, 97% da atividade da CK Total ^{42,95}, ¹¹⁵.

Por sua vez, o aumento da atividade sérica da CK BB nos períodos pós-operatórios provavelmente tem origem gástrica, já que o tecido da margem de ressecção gástrica apresentou predominância desta isoenzima. O efeito da cirurgia abdominal sobre a atividade sérica da CK BB foi estudado por TSUNG ¹⁰⁶, que detectou aumento da atividade da CK BB em 23% dos pacientes com patologias gástricas diversas, 4 horas após a cirurgia. ZWEIG e STEIRTEGHEM ¹²⁵ demonstra-

11458

ram aumento da atividade da CK BB no soro de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, que retornou aos valores basais no 4º pós-operatório, sugerindo que a CK BB pode ser liberada por lesão miocárdica.

No 6º pós-operatório, 69% dos indivíduos estudados ainda apresentaram atividade sérica da CK BB aumentada, o que possivelmente se relacionou com a liberação de quantidades significativas dessa isoenzima durante a ressecção gástrica. Por outro lado, focos metastáticos também podem ser responsáveis pela liberação da CK no sistema vascular, considerando que 77% dos indivíduos estudados apresentaram metástases em linfonodos.

Estudos a longo prazo devem ser realizados para verificar se há diminuição da atividade sérica da CK BB até valores basais (pré-operatório) ou aumento na vigência de metástases à distância.

Com relação à atividade da CK MB após a cirurgia gástrica notamos que houve aumento significativo no 1º pós-operatório. A presença de CK MB no soro frequentemente está associada à lesão miocárdica e a determinação de sua atividade tem sido utilizada como parâmetro auxiliar ao diagnóstico de cardiopatias^{22,102,116}. Quantidades significativas dessa isoenzima são liberadas no sistema vascular após a cirurgia cardíaca e a atividade sérica dessa isoenzima pode apresentar valores máximos nas 6 horas após a cirurgia⁵¹. A CK MB, também, tem sido detectada no soro de pacientes submetidos a ressecção prostática e gastro-intestinal, embora esses pacientes não tenham apresentado alterações eletrocardiográficas^{55,106}.

Podemos inferir que o aumento da atividade sérica da CK MB, nos períodos pós-cirúrgicos, se deva à liberação pelo tecido gástrico da margem de ressecção, visto que o mesmo possui quantidades consideráveis dessa isoenzima, ou ainda pode resultar do fenômeno de hibridização entre as isoenzimas CK MM e CK BB descrito ante-

riormente⁵⁹.

Ao estudarmos o perfil isoenzimático da LD nos tecidos gástricos neoplásicos verificamos que foi distinto do tecido da margem de ressecção correspondente. As atividades da LD₅, bem como, os índices LD₅/LD₁ foram significativamente superiores nos tecidos gástricos neoplásicos. Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes entre as atividades das isoenzimas LD₁, LD₂, LD₃ e LD₄ dos dois tipos de tecido.

Os tecidos que apresentam um metabolismo predominantemente anaeróbico possuem quantidades significativas das isoenzimas LD₄ e LD₅. Esse comportamento metabólico, comum nos tecidos neoplásicos, tem sido atribuído a um elevado grau de glicólise anaeróbica^{60,69,83,84,113}. CARDA-ABELLA e cols.¹¹ demonstraram que esse padrão isoenzimático pode ocorrer, em menor grau, nos tecidos gástricos com afecções benignas. Estudando pacientes com carcinomas de colon, LANGVAD e JEMEC⁶¹ observaram recorrência na maioria daqueles que apresentavam aumento da relação LD₅/LD₁ em mucosas de colon da margem de ressecção. Segundo esses autores, as alterações do perfil isoenzimático da LD na margem de ressecção gastro-intestinal, particularmente da relação LD₅/LD₁, podem ser elementos prognósticos de neoplasias gastro-intestinais recorrentes. Portanto, as determinações da atividade da LD₅, bem como da relação LD₅/LD₁, em tecidos gástricos neoplásicos têm importância considerável na caracterização de neoplasias de estômago.

O tamanho tumoral se correlacionou positivamente com as atividades enzimáticas séricas da LD Total e LD₃ e aquelas do tecido gástrico neoplásico. NANJI e JETHA⁷⁵ demonstraram correlação positiva entre a atividade enzimática sérica da LD total e o tamanho do

maior nódulo, em pacientes com mais que cinco nódulos metastáticos hepáticos. Os autores atribuíram esse resultado ao aumento de produção da LD pelas células neoplásicas.

Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo das atividades séricas da LD total, LD₂, LD₃ e LD₄ após a ressecção gástrica, sobretudo, no 1º pós-operatório. A predominância das isoenzimas LD₂ e LD₃ nesses períodos, provavelmente, se deve à liberação dessas isoenzimas pela margem de ressecção gástrica durante o ato cirúrgico, considerando que o tecido gástrico apresenta quantidades significativas dessas isoenzimas. Segundo KIMLER e SANDHU⁵⁵, a predominância da isoenzima LD₂ no soro, após a ressecção prostática, pode ser associada ao grau de hemólise observado no período pós-operatório.

Como vimos, os perfis isoenzimáticos da CK e LD nos tecidos com adenocarcinoma gástrico são característicos e podem sofrer influência do crescimento tumoral. Há relação entre esses perfis e aqueles observados no soro.

Após a gastrectomia, ocorre liberação de quantidades consideráveis de isoenzimas da CK e da LD do tecido da margem de ressecção gástrica para o sistema vascular que contribui para o aumento das atividades séricas respectivas, sobretudo, no 1º período pós-operatório.

6. CONCLUSÕES

- Os tecidos com adenocarcinoma gástrico apresentaram atividades enzimáticas e isoenzimáticas da CK inferiores às daquelas da margem de ressecção correspondente.
- O índice CKBB/CKtotal foi maior no tecido gástrico neoplásico e apresentou correlação negativa com o tamanho do tumor.
- As atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da CK, no pré-operatório, não se correlacionaram com aquelas do tecido gástrico neoplásico.
- Houve correlação positiva entre as atividades enzimáticas séricas da CK total e CK MB com as respectivas atividades do tecido da margem de ressecção.
- Houve correlação positiva entre o tamanho tumoral e o índice CKBB/CKtotal sérico, no pré-operatório.
- Após a gastrectomia houve aumento significativo das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da CK, notadamente no 1º pós-operatório.
- As atividades enzimáticas da LD₅ e o índice LD₅/LD₁ do tecido com adenocarcinoma gástrico foram significativamente superiores às daquelas do tecido da margem de ressecção.

- Houve correlação positiva entre o tamanho tumoral e as atividades da LD total, LD₁, LD₂, LD₃ e LD₄ do tecido gástrico neoplásico.
- O tamanho tumoral não se correlacionou com as atividades enzimáticas e isoenzimáticas da LD do tecido da margem de ressecção.
- As atividades séricas da LD₂ e LD₃ se correlacionaram positivamente com as respectivas atividades do tecido neoplásico e apenas a LD₃ sérica se correlacionou positivamente com a do tecido da margem de ressecção.
- Houve correlação positiva entre as atividades enzimáticas séricas da LD total, e LD₃, no pré-operatório, e o tamanho tumoral.
- Após a gastrectomia houve aumento significativo das atividades enzimáticas e isoenzimáticas séricas da LD, notadamente, no 1º pós-operatório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEYASSINE, H. & MacISAAC, S.G. - The diagnostic significance of serum creatine kinase BB isoenzyme in adenocarcinoma of prostate. Clin. Biochem., Ottawa, 13: 109-12, 1980.
2. AMADOR, E.; DORFMAN, L.E.; WACKER, W.E.C. - Serum lactic dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays. Clin. Chem., Winston-Salem, 9: 391-9, 1963.
3. ARONEY, R.S., DERMODY, W.C.; ALDENDERFER, P.; PARSONS, P.; McNITT, K.; MARANGOS, P.J.; WHITACRE, M.Y.; RUDDON, R.W.; WIERNIK, P. H.; AISNER, J. - Multiple sequential biomarkers in monitoring patients with carcinoma of the lung. Cancer Treat. Rep., Bethesda, 68: 859-66, 1984.
4. ASSICOT, M. & BOHUON, C. - Places des isoenzymes parmi les marqueurs tumoraux. Ann. Biol. Clin., Paris, 42: 329-35, 1984.
5. BOHNER, J.; STEIN, W.; STEINHART, R.; WURZBURG, U.; EGGSTEIN, M. - Macro creatine kinases: results of isoenzyme electrophoresis and differentiation of the immunoglobulin - bound type by radioassay. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 618-23, 1982.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas e local de publicação dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1984.

6. BOSL, G.J.; LANGE, P.H.; NOCHOMOVITZ, L.E.; GOLDMANN, A.; FRALEY, E.E.; ROSAI, J.; JOHNSON, K.; KENNEDY, A.B.J. - Tumor markers in advanced nonseminomatous testicular cancer. Cancer, Amsterdam, 47: 572-6, 1981.
7. BRAUER, M.J.; WEST, M.; ZIMMERMAN, H. - Serum enzymes in disease. XIII Comparison of glycolytic and oxidative enzyme and transaminase values in benign and malignant effusions with those in serum. Cancer, Amsterdam, 16: 533-41, 1963.
8. BURLINA, A.; PLEBANI, M.; RIZZOTTI, P. - Creatine kinase isoenzyme BB: A marker of gastric cancer? Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 390-1, 1983.
9. BURNAM, M.H. & SHELL, W.E. - Radioimmunoassay of inactive creatine kinase B protein in human plasma. Clin. Chim Acta, Amsterdam, 115: 33-46, 1981.
10. BURNAM, M.H.; BARSTIS, J.L.; STERN, C.S.; ROSE, D.M.; CROUCH, M.A.; HASKELL, C.M.; SINGH, B.N. - Increased inactive creatine kinase B protein in the plasma of patients with malignancy. Clin. Chem., Winston-Salem, 27: 1724-8, 1981.
11. CARDA-ABELLA, P.; PEREZ-CUADRADO, S.; MATE-JIMENEZ, J. - LDH isoenzyme patterns in human gastric mucosa with pre-cancerous changes. Cancer, Amsterdam, 42: 490-4, 1978.

12. CARDA-ABELLA, P.; PEREZ-CUADRADO, S.; LARA-BARUQUE, S.; GIL-GRANDE, L.; NUÑEZ-PUERTAS, A. - LDH isoenzyme patterns in tumors, polyps and uninvolved mucosa of human cancerous colon. Cancer, Amsterdam, 49: 80-3, 1982.
13. CHAPE, E. & HYDE, T. - Lactate dehydrogenase isoenzyme 6 with increased creatine kinase BB isoenzyme. Clin. Chem., Winston-Salem, 30: 153-4, 1984.
14. CHO, H.W.; MELTZER, H.Y.; JOUNG, J.I.; GOODE, D. - Effect of incubation in human plasma on eletrophoretic mobility of brain-type creatine phosphokinase. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 73: 257-65, 1976.
15. COMMITTEE ON PROFESSIONAL EDUCATION OF INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (UICC) - Clinical oncolgy, New York, Springer-Verlag, 1973, 321 p.
16. COOLEN, R.B. & PRAGAY, D.A. - The production of brain type creatine kinase in the serum of patients with oat-cell carcinoma. Clin Chem., Winston-Salem, 22: 1174-5, 1976.
17. COOLEN, R.B.; PRAGAY, D.A.; NOSANCHUK, J.S.; BELDING, R. - Elevation of brain-type creatine kinase in serum from patients with carcinoma. Cancer, Amsterdam, 44: 1414-8, 1979.
18. COSTA NETO, P.L.O. - Estatística, São Paulo, Edgard Blücher, 1977, 264 p.

19. CRISS, W.E. - A review of isoenzymes in cancer. Cancer Res., Philadelphia, 31: 1523-43, 1971.
20. CSAKO, G.; PAPADOPOULOS, N.M.; JETT, G.K.; McINTOSH, C.L. - Five creatine kinase isoenzymes in serum of a patient with severe heart disease. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 2170-2, 1982.
21. DAWSON, D.M. & FINE, I.H. -Creatine kinase in human tissues. Arch. Neurol., Chicago, 16: 175-80, 1967.
22. ELEVITCH, F.R. & BROWNLOW, K. - A new fluorometric determination of serum creatine phosphokinase isoenzymes: detection of CPK-2 in myocardial infarction and fatal cardiovascular disorders. Amer. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 59: 133-4, 1973.
23. FARRON, F.; HSU, H.H.T.; KNOX, W.E. - Fetal-type isoenzymes in hepatic and nonhepatic rat tumors. Cancer Res., Philadelphia, 32: 302-8, 1972.
24. FELD, R.D. & WITTE, D.L. - Presence of creatine kinase BB isoenzyme in some patients with prostatic carcinoma. Clin. Chem., Winston-Salem, 23: 1930-2, 1977.
25. FLYNN, M.M. & BHAGAVAN, N.V. - Lactate dehydrogenase-6: a case with acute onset and resolution. Clin. Chem., Winston-Salem, 32: 562, 1986.

26. GARRET, C.T. - Oncogenes: critical review. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 156: 1-40, 1986.
27. GAZDAR, A.F.; ZWEIG, M.H.; CARNEY, D.N.; VAN STEIRTEGHEN, A.C.; BAYLIN, S.B.; MINNA, J.D. - Levels of creatine kinase and its BB isoenzyme in lung cancer specimens and cultures. Cancer Res., Philadelphia, 41: 2773-7, 1981.
28. GERHARDT, W. - Creatine kinase. In: BERGMEYER, H. U., ed., Methods of enzymatic analysis, 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie, 1983, p. 508-39.
29. GERMAN SOCIETY OF CLINICAL CHEMISTS. Standar method for determination of creatine kinase activity. Revised draft of 1976. J. Clin. Chem. Biochem., Berlin, 15: 255-60, 1977.
30. GOFFMAN, T.; CANTRELL, J.; SCHEIN, P. - Unexplained increase in serum creatine kinase isoenzyme MB activity in a lung cancer patient. Clin. Chem., Winston-Salem, 27: 2068-9, 1981.
31. GOLDMAN, R.D.; KAPLAN, N.O.; HALL, T.C. - Lactic dehydrogenase in human neoplastic tissues. Cancer Res., Philadelphia, 24: 389-99, 1964.
32. GREENSTEIN, J.P. - Biochemistry of cancer. 2 ed., New York, Academic Press, 1954, p. 327-506.

33. GRIFFITHS, J.C. - Creatinquinasa: isoenzima 1. In: STATLAND, B. E. & WINKEL, P. El laboratorio en las enfermedades malignas, Buenos Aires, Editora Medica Panamericana, 1982, p. 75-89.
34. GROBBEL, M.A.; LAWSON, N.S.; CALAM, R.R. - Cathodal creatine kinase band, a poor prognostic sign in malignancy. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 1995-6, 1982.
35. HASSANALY, F.; DESCH, G.; MARTIN, R.; CHARRIER, N.; RABANIT, A.; SOUTIF, A.; AUTRAN, P. - Présence simultanée d'isoenzymes CK-BB et CKm de la créatine kinase sérique au cours d'un cancer broncho-pulmonaire à petit cellules. Limites de l'utilisation des techniques d'immunoinhibition des sous-unités M. Ann. Biol. Clin., Paris, 44: 412-4, 1986.
36. HEINZ, J.W.; O'DONNELL, N.J.; LOTT, J.A. - Apparent mitochondrial creatine kinase in serum of a patient with metastatic cancer to the liver. Clin. Chem., Winston-Salem, 26: 1908-11, 1980.
37. HENDERSON, A.R. - Isoenzymes of lactate dehydrogenase. In: BERGMAYER H.U., ed., Methods of enzymatic analysis, 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie, 1983, p. 138-55.
38. HOAG, G.N.; FRANKS, C.R.; DeCOTEAU, W.E. - Creatine kinase isoenzymes in seum of patients with cancer of various organs. Clin. Chem., Winston-Salem, 24: 1654, 1978.

39. HOMBURGER, H.A.; MILLER, S.A.; JACOB, G.L. - Radioimmunoassay of creatine kinase B-isoenzymes in serum of patients with azotemia, obstructive uropathy, or carcinoma of the prostate or bladder. Clin. Chem., Winston-Salem, 26: 1821-4, 1980.
40. JAMES, G.P. & HARRISON, R.L. - Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum. Clin. Chem., Winston-Salem, 25: 943-7, 1979.
41. JAYNES, P. & FELD R.D. - Creatine kinase isoenzymes in serum of a patient with gall-bladder cancer. Clin. Chem., Winston-Salem, 27: 1316-7, 1981.
42. JOCKERS-WRETOU, E. & PFLEIDERER, G. - Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 58: 223-32, 1975.
43. JURGA, B.; KLVAŇA, M.; MATULA, P.; WAGNEROVÁ, M. - Importance of determinations of serum hexokinase, aldolase, and lactate dehydrogenase activities, and of the lactate/pyruvate-quotient in the diagnosis of malignant tumors. Neoplasma, Bratislava, 25: 95-106, 1978.
44. KANEMITSU, F. - Critical significance and characteristics of creatine kinase-immunoglobulin complexes in sera from patients with malignant tumors. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 160: 19-26, 1986.

45. KANEMITSU, F.; KAWANISHI, I.; MIZUSHIMA, J. - Three atypical serum creatine kinases in a patient with carcinoma of the colon. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 112: 275-83, 1981.
46. KANEMITSU, F.; KAWANISHI, I.; MIZUSHIMA, J. - Characteristics of mitochondrial creatine kinases from normal human heart and liver tissues. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 119: 307-17, 1982.
47. KANEMITSU, F.; KAWANISHI, I.; MIZUSHIMA, J. - The origin of a cathode-migrating creatine kinase found in serum from a cancer patient. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 122: 377-83, 1982.
48. KANEMITSU, F.; KAWANISHI, I.; MIZUSHIMA, J. - A new creatine kinase found in mitochondrial extracts from malignant liver tissue. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 128: 233-40, 1983.
49. KANEMITSU, F.; KAWANISHI, I.; MIZUSHIMA, J.; OKIGAKI, T. - Mitochondrial creatine kinase as a tumor-associated marker. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 138: 175-83, 1984.
50. KANEMITSU, F. & OKIGAKI, T. - Comparison of enzymatic characteristics of creatine kinase BB from human healthy and tumor stomach tissues. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 151: 23-31, 1985.
51. KESHGEGIAN, A.A. & MARCHANT, B.L. - Cathodal bands in electrophoretograms of creatine kinase isoenzymes in serum collected after cardiac surgery: a poor prognostic sign. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 1727-30, 1983.

52. KETCHUM, C.H.; ROBINSON, C.A.; HALL, L.M.; GRISSLE, W.E.; MACLAREN, N.K.; RILEY, W.J.; TROST, C. - Clinical significance and partial biochemical characterization of lactate dehydrogenase isoenzyme 6. - Clin. Chem., Winston-Salem, 30: 46-9, 1984.
53. KEW, M.C.; WOLF, P.; WHITTAKER, D.; ROWER, P. - Tumor-associated isoenzymes of gamma-glutamyl transferase in the serum of patients with hepatocellular carcinoma. Br. J. Cancer, London, 50: 451-5, 1984.
54. KIKUCHI, Y.; KIZAWA, I.; KOYAMA, E.; KATO, K. - Significance of serum tumor markers in patients with carcinoma of the ovary. Obstet. Gynecol., Amsterdam, 63: 561-6, 1984.
55. KIMLER, S.C. & SANDHU, R.S. - Circulating CK-MB and CK-BB isoenzymes after prostate resection. Clin. Chem., Winston-Salem, 26: 55-9, 1980.
56. KNOX, W.E. - The enzymic pattern of neoplastic tissue. Adv. Cancer Res., New York, 10: 117-61, 1967.
57. KOVEN, I.H.; FREEDMAN, M.; MILLER, D.; REECE, S.; MAITLAND, A.; SIGURDSON, E.; BLACKSTEIN, M.E. - Macro-creatine Kinase 2. A possible marker of gastrointestinal cancer? Surgery, St. Louis, 94: 631-5, 1983.
58. KWONG, T.C. & ARVAN, D.A. - How many creatine kinase "isoenzymes" are there and what is their clinical significance? Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 115: 3-8, 1981.

59. LANG, H. & WURZBURG, U. - Creatine Kinase, an enzyme of many forms. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 1439-47, 1982.
60. LANGVAD, E. - Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in the tumor-bearing colon. Int. J. Cancer, Geneva, 3: 17-29, 1968.
61. LANGVAD, E. & JEMEC, B. - Prediction of local recurrence in colorectal carcinoma: an LDH isoenzymatic assay. Br. J. Cancer, London, 31 : 661-4, 1975.
62. LEDERER, W.H. & GERSTBREIN, H.L. - Creatine Kinase isoenzyme BB activity in serum of a patient with cancer. Clin. Chem., Winston-Salem, 22: 1748-9, 1976.
63. LIU, I.Z.; KIM, Y.S.; SHOHET, S.B. - Atypical cathodically migrating creatine kinase: a possible tumor-associated enzyme marker for disseminated malignancy. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 1560, 1982.
64. LJUNGDAHL, L. & GERHARDT, W. - Creatine Kinase isoenzyme variants in human sera. Clin. Chem., Winston-Salem, 24: 832-4, 1978.
65. LOSHON, C.A.; RITTENHOUSE, S.E.; BOWERS, G.N.; McCOMB, R.B. - Unusual findings related to atypical creatine kinases in two hospitalized patients. Clin. Chem., Winston-Salem, 32: 207-10, 1986.

66. LUDVIGSEN, C.W.; MUUS, C.; MEYER, I.; HAVEN, M. - Creatine Kinase variant type I in children with anoxic insult. Clin. Chem., Winston-Salem, 32: 689-91, 1986.
67. LUNA, R.M.; SUAREZ, J.C.; GORDON, S.B.; CERESA, A.D.; WALDMANN, L.E. - Niveles enzimáticos séricos en tumores con y sin metástasis. Prensa Méd. Argent., Buenos Aires, 59: 1878-81, 1973.
68. MASSEY, W.H.; DENNIS, D.L.; FLETCHER, W.S.; WOOD, D.C. - Lactic dehydrogenase isoenzyme alterations in malignant disease of the liver. Am. J. Surg., New York, 122: 209-15, 1971.
69. MATE, J.; PAJARES, J.M.; MORENO-OTERO, R.; PEREZ-CUADRADO, S. - Abnormal lactic dehydrogenase patterns in carcinoma of stomach and in peritumoral tissues. Digestion, Basel, 17: 377-82, 1978.
70. MCKENZIE, D.; HENDERSON, A.R.; GORDESKY, S.E.; EWEN, L.M.; VLOEDMANN, D.A. - Electrophoresis of lactate dehydrogenase isoenzymes. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 189-95, 1983.
71. MEDEIROS, L.J.; WALSH, D.; GERSON, B. - Interference by macro kinase type 1 with an immunoenzymatic method for quantification of CK-MB in serum. Clin. Chem., Winston-Salem, 32: 710-1, 1986.

72. MEYER, I.J.; THOMPSON, J.A.; KISER, E.J.; HAVEN, G.T. - Observations of a variant creatine kinase isoenzyme in sera and breast tumor cytosols. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 74: 332-6, 1980.
73. MIYAKE, S.; TAKEDA, K.; IZUMI, M.; NAGASHIMA, H.; NISHINA, Y.; KAWANISHI, K.; OFUJI, T.; SHIMONO, K. - Cathodic isoenzyme of serum creatine kinase in a case of stomach cancer complicated by disseminated intravascular coagulation. Clin. Chim Acta, Amsterdam, 108: 323-8, 1980.
74. NAKAGAWA, H.; KIDA, N.; MAEDA, M.; WAKUTA, Y.; OHTAKI, S. - An abnormal isoenzyme of creatine kinase in serum of a patient with metastatic carcinoma: identity with mitochondrial creatine kinase. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 723-5, 1982.
75. NANJI, A.A. & JETHA, N. - Do some commonly measured serum enzyme activities correlate with the extent of metastatic tumor involvement of the liver? Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 2001-2, 1982.
76. NAVAJAS, F. - Isoenzimas y cáncer. Anál. Clín., Sevilla, 44: 201-8, 1986.
77. NISSEN, N.J. & BOHN, L. - Patterns of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in normal and malignant tissues. Eur. J. Cancer, Oxford, 1: 217-9, 1965.

78. PETTERSSON, T.; WEBER, T.H.; OJALA, K. - Creatine Kinase isoenzyme BB as a tumor marker in pleural effusions. Clin. Chem., Winston-Salem, 27: 1147-8, 1981.
79. PIRICK, K.; GRANINGER, W.; SCHCEWEISS, B.; SCHUSTES, R.; SENZHOFFER, R.; GABL, F. - Significance of laboratory chemical parameters for the detection of metastases in breast cancer. Wien. Klin. Wochenschr., Vienna, 95: 778-81, 1983.
80. PLOMTEUX, G. & TOULET, J. Enzymogrammes du cancer secondaire du foie. Sem. Hop., Paris, 50: 1931-3, 1974.
81. POTTER, V.R. - Biochemical perspectives in cancer research. Cancer Res., Philadelphia, 24: 1085-98, 1964.
82. PRABHAKARAN, V.; NEALON, D.A.; HENDERSON, A.R. - Interaction between human Ig G and human creatine kinase isoenzyme - 1 in serum: a route for the intravascular catabolism of creatine kinase-1? Clin. Chem., Winston-Salem, 25: 112-6, 1979.
83. PROCHÁZKA, B.; JIRASEK, V.; BÁRTA, V.; KOROUT, J.; KORBOVÁ, L.; SCHLUPEK, A.; SLEZÁK, Z. - Differences in lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in various parts of the human stomach and in gastritis, peptic ulcer, and gastric carcinoma. Gastroenterology, New York, 54: 65-71, 1968.

84. OLIVER, J.A.; EL HILALI , M.M.; BELITSKY, P.; MacKINNON, K.J. - LDH isoenzymes in benign and malignant prostate tissue. Cancer, Amsterdam, 25: 863-6, 1970.
85. RICE, E.W. - Improved biuret procedure for routine determination of urinary total proteins in clinical proteinuria. Clin. Chem., Winston-Salem, 21: 398-401, 1975.
86. ROBINS, S.L.; ANGELL, M.; KUMAR, V. - Patologia Básica, São Paulo, Atheneu: Editora da USP, 1986, p. 91-150.
87. SAX, S.M.; MOORE, J.J.; GIEGEL, J.L.; WELSH, M. - Further observations on the incidence and nature of atypical creatine kinase activity. Clin. Chem., Winston-Salem, 25: 535-41, 1979.
88. SCHAPIRA, F. - Foetal enzyme patterns in cancer tissues. Rev. Eur. Etud. Clin. Biol., Paris, 16: 205-8, 1971.
89. SCHWARTZ, M.K. - Biochemical procedures in different forms of cancer. Med. Clin. North Am., Philadelphia, 55: 613-24, 1971.
90. SCHWARTZ, M.K. - Enzymes in cancer. Clin. Chem., Winston-Salem, 19: 10-22, 1973.
91. SCHWARTZ, M.K. - Biochemical procedures as aids in diagnosis of different forms of cancer. Ann. Clin. Lab. Sci., Philadelphia, 4: 95-102, 1974.

92. SCHWARTZ, M.K. - Pruebas enzimáticas en canceriología. In: STALAND, B.E. & WINKEL, P., eds.. El laboratorio en las enfermedades malignas, Buenos Aires, Editora Medica Panamericana, 1982, p. 61-74.
93. SIEGEL, S. - Estatística não paramétrica, São Paulo, Editora McGraw-Hill do Brasil, 1981, 350 p.
94. SILVERMAN, L.M.; DERMER, G.B.; ZWEIG, M.H.; VAN STEIRTEGHEM, A. C.; TOKES, Z.A. - Creatine Kinase BB: a new tumor-associated marker. Clin. Chem., Winston-Salem, 25: 1432-5, 1979.
95. SMITH, A.F. - Separation of tissue and serum creatine kinase isoenzymes on polyacrylamide gel slabs. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 39: 351-9, 1972.
96. STEGHENS, J. P.; MAIRE, I.; MATHIEU, M. - Human placenta as a convenient source of creatine kinase BB. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 1537-9, 1983.
97. STEGHENS, J. P. & MAIRE, I. - Les méthodes de mesure des isoenzymes de la créatine kinase (iso CK) en chimie clinique: revue générale. Int. Sci. Biol., Paris, 10: 384-99, 1984.
98. STEIN, W.; BOHNER, J.; STEINHART, R.; EGGSTEIN, M. - Macrocreatinine Kinase: determination and differentiation of two types by their activation energies. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 19-24, 1982.

99. STEIN, W.; BOHNER, J.; RENN, W.; MAULBETSCH, R. - Macro creatine kinase type 2: results of a prospective study in hospitalized patients. Clin. Chem., Winston-Salem, 31: 1959-64, 1985.
100. STERN, J.R.; SCHUMAKER, L.; BALCH, B.; THOMASON, R. - Lactate dehydrogenase isoenzyme 6 with increased creatine kinase BB isoenzyme. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 1443-4, 1983.
101. STROM, S. & BENDZ, R. - Creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes in stage D prostatic carcinoma. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 159: 219-28, 1986.
102. STRUFALDI, B. - Alteração dos níveis de creatina-quinase (ATP: creatina-fosfotransferase E.C. 2.7.3.2.) e de suas isoenzimas, durante o enfarte do miocárdio: estudo de nova metodologia. São Paulo, 1977, 98p. (tese - Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
103. VAN DER VEEN, K.J. & WILLEBRANDS, A.F. - Isoenzymes of creatine phosphokinase in tissue extracts and in normal and pathological sera. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 13: 312-6, 1966.
104. THOMPSON, R.J.; RUBERY, E.D.; JONES, H.M. - Radioimmunoassay of serum creatine Kinase-BB as a tumor marker in breast cancer. Lancet, London, 27: 673-5, 1980.
105. TSUNG, S. H. - Creatine kinase isoenzyme patterns in human tissue obtained at surgery. Clin. Chem., Winston-Salem, 22: 173-5, 1976.

106. TSUNG, S.H. - Circulating CK-MB and CK-BB isoenzymes after gastroenteral surgery. J. Clin. Pathol., London, 35: 200-3, 1982.
107. TSUNG, S.H. - Total CK activity and isoenzyme patterns in normal and neoplastic tissue of gastrointestinal tract. J. Clin. Pathol., London, 35: 204-6, 1982.
108. TSUNG, S.H. - Creatine kinase activity and isoenzyme pattern in various normal tissues and neoplasms. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 2040-3, 1983.
109. URDAL, P. & LANDAAS, S. - Macro creatine kinase BB in serum, and some data on its prevalence. Clin. Chem., Winston-Salem, 25: 461-5, 1979.
110. URDAL, P.; URDAL, K.; STRØMME, J.H. - Cytoplasmic creatine kinase isoenzymes quantitated in tissue specimens obtained of surgery. Clin. Chem., Winston-Salem. 29: 310-3, 1983.
111. USUI, A.; FUJITA, K.; IMAIZUMI, M.; ABE, T.; INOUE, K.; MATUMOTO, S.; KATO, K. - Determination of creatine kinase isoenzymes in sera and tissues of patients with various lung carcinomas. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 164: 47-53, 1987.
112. WARBUG, O. - Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs, Paris, Félix Alcan, 1928, 950 p.

113. WARBURG, O. - On the origin of cancer cells. Science, Washington, 123: 309-14, 1956.
114. WHELAN, P.V. & MALKUS, H. - A macro creatine kinase isoenzyme in serum of apparently health individuals. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 1411-4, 1983.
115. WOLD, L.E.; LI, C.Y.; HOMBURGER, H.A. - Localizaton of the B and M polypeptide subunits of creatine kinase normal and neoplastic human tissues by immunoperoxidase technic. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 75: 327-32, 1981.
116. WONG, R. & SWALLAGEN, T.O. - Cellophane acetate electrophoresis of creatine phosphokinase isoenzymes in the diagnosis of myocardial infarction. Amer. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 64: 209-16, 1975.
117. WOOD, D.C.; VARELA, V.; PALMQUIST, M.; WEBER, F. - Serum lactic dehydrogenase changes in clinical cancer. J. Surg. Oncol., New York, 5: 251-7, 1973.
118. WROBLEWSKI, F. - The clinical significance of alterations in lactic dehydrogenase activity of body fluids. Am. J. Med. Sci., Thorofare, 234: 301-12, 1957.
119. WROBLEWSKI, F. & GREGORY, K.F. - Lactic dehydrogenase isoenzymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 94: 912-32, 1961.

120. WU, A.H.B. & BOWERS Jr., G.N. - Evaluation and comparison of immunoinhibition and immunoprecipitation methods for differentiating MB from BB and macro forms of creatine kinase isoenzymes in patients and health individuals. Clin. Chem., Winston-Salem, 28: 2017-21, 1982.
121. WU, A.H.B.; HERSON, V.C.; BOWERS Jr., G.N. - Macro creatine kinase types 1 and 2: clinical significance in neonates and children as compared with adults. Clin. Chem., Winston-Salem, 29: 201-4, 1983.
122. WÜRZBURG, U. & SROBEL, R. - Immunoinhibition test for creatine kinase-B subunit: a comparison of monoclonal mouse and polyclonal antibodies. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Berlin, 19: 543-4, 1981.
123. YUU, H.; TAKAGI, Y.; SENJU, O.; HOSOYA, J.; GOMI, K.; ISHII, T. - Creatine kinase isoenzyme of high relative molecular mass in serum of a cancer patient. Clin. Chem., Winston-Salem, 24: 2054-7, 1978.
124. YUU, H.; ISHIZAWA, S.; TAKAGI, Y.; GOMI, K.; SENJU, O.; ISHII, T. - Macro creatine kinase: a study on CK-linked immunoglobulin. Clin. Chem., Winston-Salem, 26: 1618 - 20, 1980.
125. ZWEIG, M.H. & VAN STEIRTEGHEM, A.C. - Increased CK-BB concentration in serum following cardiac surgery. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 93 : 29-33, 1979.

126. ZWEIG, M.H.; SILVERMAN, L.M.; DERMER, G.B.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. - Serum creatine kinase isoenzyme BB as indicator of active metastatic disease. Clin. Chem., Winston-Salem, 25: 1190-1, 1979.
127. ZWEIG, M.H. & VAN STEIRTEGHEM, A.C. - Assessment by radioimmunoassay of serum creatine kinase BB (CK-BB) as a tumor marker: studies in patients with various cancers and a comparison of CK-BB concentrations to prostatic acid phosphatase concentrations. J. Nat. Cancer. Inst., Bethesda, 66: 859-62, 1981.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade de São Paulo

R E S U M O

As atividades enzimáticas e isoenzimáticas da CK e da LD foram determinadas nos tecidos gástricos neoplásico e da margem de ressecção e no soro de indivíduos com adenocarcinoma de estômago, submetidos à gastrectomia.

O tecido gástrico neoplásico apresentou índices CKBB/CKtotal e LD₅/LD₁, bem como atividade da LD₅, superiores aos da margem de ressecção correspondente.

No pré-operatório, os indivíduos estudados apresentaram elevação da atividade sérica da CK BB (100%) e da CK MB (69%). Este fato, possivelmente, resultou da liberação dessas isoenzimas pelo próprio neoplasma ou, também pelo tecido normal adjacente. As atividades séricas das isoenzimas da LD apresentaram-se dentro dos valores de referência, nesse período.

Após a gastrectomia, houve aumento significativo das atividades isoenzimáticas séricas da CK e da LD com relação àquelas do pré-operatório, notadamente, no 1º período pós-operatório. Tais alterações foram atribuídas à liberação dessas isoenzimas pelos tecidos lesados durante o ato cirúrgico.