

**MARGARIDA PAULA REBELO NUNES DE FREITAS SILVA**

**Hipertensão Arterial e Carcinoma do Endométrio:  
O Papel dos Polimorfismos I/D no Gene que Codifica a  
Enzima Conversora da Angiotensina.**

**MESTRADO EM ONCOLOGIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO**



Instituto Português de Oncologia  
Francisco Gentil



**UNIVERSIDADE DO PORTO**



**Jefferson  
Medical  
College**

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU  
DE MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO  
DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

**HIPERTENSÃO ARTERIAL E CARCINOMA DO ENDOMÉTRIO:**

**O Papel dos Polimorfismos I/D no Gene que Codifica a  
Enzima Conversora da Angiotensina.**

**MARGARIDA PAULA REBELO NUNES DE FREITAS SILVA**

**PORTO, 2001**

**Aos meus coelhos**

**NOTA PRÉVIA:**

Nesta dissertação são apresentados os resultados do trabalho desenvolvido no âmbito do Mestrado em Oncologia. Estes resultados foram parcialmente apresentados no Congresso Nacional de Medicina Interna, 2000, premiados com a Menção Honrosa do Prémio 2000 da Sociedade Portuguesa de Ginecologia e publicados em *Ginecologia e Medicina da Reprodução* (2001), 26: 27-34 e *Annals of Oncology* (2000), 11: 213.

<b>Índice</b>	<b>página</b>
<b>Resumo</b>	<b>6</b>
<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>Introdução</b>	<b>8</b>
<b>Objectivos</b>	<b>22</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>24</b>
<b>Resultados</b>	<b>27</b>
<b>Discussão</b>	<b>33</b>
<b>Referências</b>	<b>39</b>
<b>Estudos Futuros</b>	<b>43</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>45</b>

---

## RESUMO

**Titulo** - Hipertensão e Carcinoma do Endométrio: O Papel dos Polimorfismos I/D no Gene que Codifica a Enzima Conversora da Angiotensina.

**Introdução:** A hipertensão arterial é um dos factores de risco referidos para o carcinoma do endométrio. A activação do sistema renina-angiotensina tem um papel importante no desenvolvimento da hipertensão arterial (HTA). A avaliação da sua importância no carcinoma do endométrio e a sua associação com o polimorfismo I/D da ECA (enzima conversora da angiotensina) com os seus genótipos DD, ID e II é o objectivo do presente estudo.

**Material e Métodos:** Foi estudado o polimorfismo I/D da ECA pela metodologia de PCR em DNA isolado de sangue periférico de um grupo de 61 doentes com carcinoma do endométrio (idade média global:  $63,6 \pm 9,5$  anos). Foi considerada a tensão arterial na admissão tendo sido utilizados os critérios de classificação da hipertensão arterial propostos pela Organização Mundial de Saúde.

**Resultados:** Foi detectado o genótipo DD em 29 doentes, ID em 27 doentes e II em 5 doentes o que corresponde a uma frequência alélica de 69,6% para o D e 30,4% para o I. No grupo de doentes com HTA (n=40), 21 tinham genótipo DD, 17 genótipo ID e dois casos o genótipo II. Nas doentes sem HTA (n=21), 8 tinham genótipo DD, 10 genótipo ID e 3 o genótipo II. Nas doentes sem HTA (normotensas) a presença do alelo I (genótipos ID e II) parece estar associado a uma idade mais precoce de aparecimento de carcinoma do endométrio ( $56,0 \pm 10,1$  vs  $65,8 \pm 9,9$ ;  $p=0,029$ ), enquanto que para o grupo das doentes hipertensas esta relação não foi significativamente diferente ( $66,5 \pm 8,9$  vs  $64,4 \pm 7,4$ ;  $p=0,435$ ).

**Conclusões:** Neste estudo, é formulada a hipótese de que parece existir uma correlação entre a presença do alelo I e idade mais precoce de aparecimento de carcinoma do endométrio particularmente em doentes normotensas. A confirmação destes resultados em grandes grupos de doentes com esta patologia pode conduzir ao estudo de uma estratégia de abordagem, nomeadamente no campo da quimioprevenção.

## SUMMARY

**Title** – Blood Hypertension and Endometrial Cancer: The Role of Angiotensin Converting Enzyme Genetic Polymorphism

**Background:** Endometrial carcinoma is one of the most common gynaecological malignancies. Most cases are diagnosed in older patients with diabetes, hypertension or obesity. The renin-angiotensin system (RAS) has a central role controlling blood pressure and sodium homeostasis. RAS polymorphisms have been reported as genetic determinants of essential hypertension.

**Objective:** The aim of our study was to evaluate the prevalence of I or D alleles for the angiotensin-converting-enzyme (ACE) in sixty one cases of women with the diagnosis of endometrial carcinoma (mean age:  $63,6 \pm 9,5$ ).

**Material and Methods:** The presence of a ACE polymorphism was analysed by PCR in DNA isolated from blood samples. DNA isolation was performed with the “salting-out” methodology and PCR products were analysed by electrophoresis on an ethidium-bromide stained agarosis gel and visualised under a UV light.

**Results:** We detected DD genotype in 29 cases, ID genotype in 27 cases and II genotype in 5 cases. The allele frequency was 0.69 for D allele and 0.30 for I allele. DD genotype was detected in 21 cases with hypertension (H) and 8 normotensive (N), ID genotype in 17 cases H and in 10 cases N, II genotype in 2 cases H and 3 cases N. In normotensive we found that the presence of I allele (genotypes ID and II) is significantly associated to an earlier age ( $56,0 \pm 10,1$  vs  $65,8 \pm 9,9$ ) of onset of endometrial carcinoma ( $p=0.029$ ).

**Conclusion:** Our findings suggests that ACE polymorphism may be associated to the development of endometrial carcinoma and to the onset of this tumor on younger women.

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

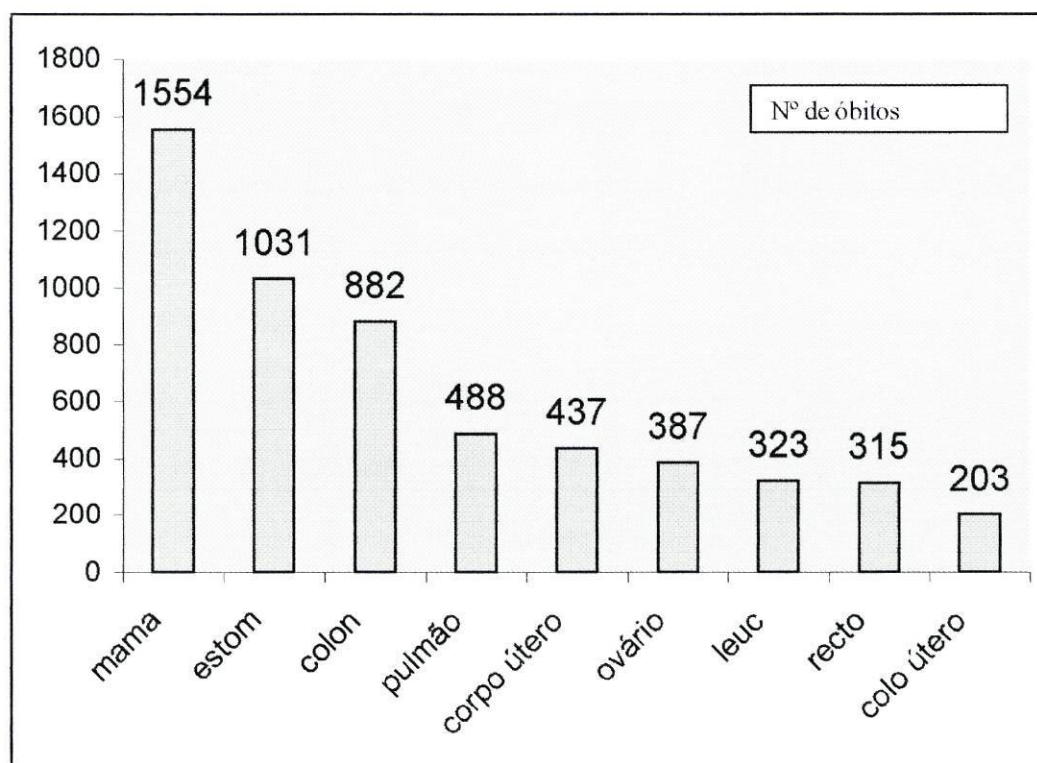
O aumento da incidência de cancro observada nas últimas décadas é actualmente factor importante na determinação e planificação de estratégias de Saúde Pública, constituindo forte motivação para o incremento da investigação neste campo científico. Em Portugal, e segundo as informações disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Estatística, referentes a 1998, o cancro aparece como uma das principais causas de mortalidade na Mulher (Quadro 1).

**Quadro 1.** Dez principais causas de morte na mulher em Portugal (1998)

<b>Causa</b>	<b>Nº de Óbitos</b>
<i>D. Cerebrovasculares</i>	<i>12 401</i>
<i>Cancro</i>	<i>8 605</i>
<i>D. Isquémica Cardíaca</i>	<i>4 181</i>
<i>Diabetes</i>	<i>1 978</i>
<i>Pneumonia</i>	<i>1 881</i>
<i>S. Nefrótico, Nefrite</i>	<i>605</i>
<i>D. Crónica do Fígado, Cirrose</i>	<i>546</i>
<i>Embolia Pulmonar</i>	<i>488</i>
<i>Acidentes</i>	<i>427</i>
<i>D. Hipertensivas</i>	<i>405</i>

Fonte: Instituto Nacional de Estatística

O carcinoma do endométrio é uma das neoplasias ginecológicas mais frequentes na mulher. Nos países desenvolvidos é a quarta neoplasia mais frequente, depois do cancro da mama, pulmão e colon. Em Portugal, as taxas de incidência do cancro do endométrio colocam esta neoplasia como a quinta causa de morte por cancro na mulher (8,4 casos por 100 000 habitantes) e em segundo lugar entre os tumores ginecológicos mais frequentes.(3)



**Figura 1.** Principais causas de morte por cancro na Mulher (Fonte: Instituto Nacional de Estatística, 1998)

A incidência é muito baixa nos países em desenvolvimento e parece haver uma diferença racial nas taxas de incidência. A mulher branca tem um risco relativo duas vezes superior à mulher negra.(1,2,4)

O carcinoma do endométrio é uma doença primariamente da mulher pós-menopausa, contudo cerca de 25% dos casos ocorrem em mulheres na pré-menopausa, com 5% dos casos diagnosticados em doentes com menos de 40 anos de idade. Durante a última década verificou-se um aumento na incidência desta neoplasia em mulheres mais jovens.

### **Factores de risco**

A exposição excessiva aos estrogénios está associada com a maioria dos factores de risco que têm sido descritos para o carcinoma do endométrio. A estimulação continuada do endométrio pelos estrogénios poderá resultar em hiperplasia endometrial. Mulheres com hiperplasia e atípia citológica têm um risco aumentado em 23% de desenvolver o carcinoma do endométrio na década seguinte. Vários estudos caso-controlo demonstraram que o risco para carcinoma do endométrio está aumentado de 4 a 15 vezes em mulheres com exposição prolongada a estrógenos.(1,4)

A obesidade é um dos factores de risco para o carcinoma do endométrio habitualmente referenciados na literatura.(1) Na mulher obesa o desenvolvimento de cancro está relacionado com os estrogénios endógenos produzidos no tecido adiposo através da conversão da androstenediona em estrona pela acção da enzima aromatase.

O grau de risco é correlacionável com a severidade da obesidade, e está aumentado cerca de 10 vezes em mulheres com um excesso de peso superior a 23 kg em relação ao peso ideal.(1,4)

A menarca precoce e a menopausa tardia são factores de risco para o carcinoma do endométrio, por aumentarem o tempo de exposição do endométrio aos estrogénios. Cinco a quinze por cento das doentes com tumores do ovário produtores de estrógenios (granulosa e teca) têm carcinomas síncronos do endométrio.

A nuliparidade é outro factor de risco. Durante a gravidez a hormona predominante é a progesterona, ocorrendo assim interrupção transitória da contínua estimulação do endométrio pelos estrogénios.

Outros factores de risco com estudos de risco relativo (RR) conhecidos e referidos como importantes na gênese desta neoplasia são a diabetes mellitus (RR=2,7) e a hipertensão arterial (RR=1,5).(1,4) No entanto, e á luz dos conhecimentos actuais não estão esclarecidos os mecanismos fisiopatológicos ou factores genéticos envolvidos nesta associação.

### *Hipertensão Arterial*

A hipertensão arterial (HTA) continua a ser um importante e grave problema de Saúde Pública no início deste novo milênio, apesar de toda a investigação efectuada tanto no domínio da Epidemiologia como das Ciências Básicas. Nas últimas duas

décadas verificou-se um aumento significativo no número de doentes diagnosticados e tratados como hipertensos, facto que se traduziu numa redução de 40 a 60% na mortalidade por doença coronária e acidente vascular cerebral, tendência que se tem invertido nos últimos cinco anos com aumento da mortalidade por insuficiência cardíaca (1ª causa de morte nos USA), insuficiência renal terminal e acidente vascular cerebral (1ª causa de morte em Portugal e 3ª nos USA), patologias para as quais a HTA é um dos factores de risco mais importantes.(3,5)

Segundo dados do Joint Internacional Committee on Prevention, Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (5) (JNC VI 1999) e da Organização Mundial de Saúde, somente 30% dos doentes hipertensos medicados têm valores tensionais controlados, situação semelhante que se verifica na América do Norte e na Europa.(5)

#### *Prevalência da Hipertensão Arterial*

A prevalência da HTA depende do perfil racial da população estudada e dos critérios de classificação usados para a definir. Não existem dados disponíveis para caracterizar a causa de HTA em cerca de 95% do casos diagnosticados na população em geral. (6)

Nas mulheres, a prevalência da HTA correlaciona-se directamente com a idade com um aumento significativo dos valores tensionais após os 50 anos de idade. Este facto pode estar relacionado com as alterações hormonais da menopausa.

A resistência á insulina ou hiperinsulinismo está associada com o aumento da tensão arterial em indivíduos hipertensos. Tanto a obesidade como a diabetes mellitus não insulino dependente (DMNID) são mais frequentes em doentes hipertensos do que em normotensos.

O hiperinsulinismo pode aumentar a tensão arterial por um ou mais mecanismos:

- Hiperinsulinemia produz retenção de sódio renal e aumenta a actividade do sistema simpático.
- Hipertrofia muscular lisa dos vasos sanguíneos secundária á acção mitogénica da insulina.
- A insulina modifica o transporte de ions através da membrana celular, aumentando o cálcio intracelular no rim e tecidos sensíveis á insulina.

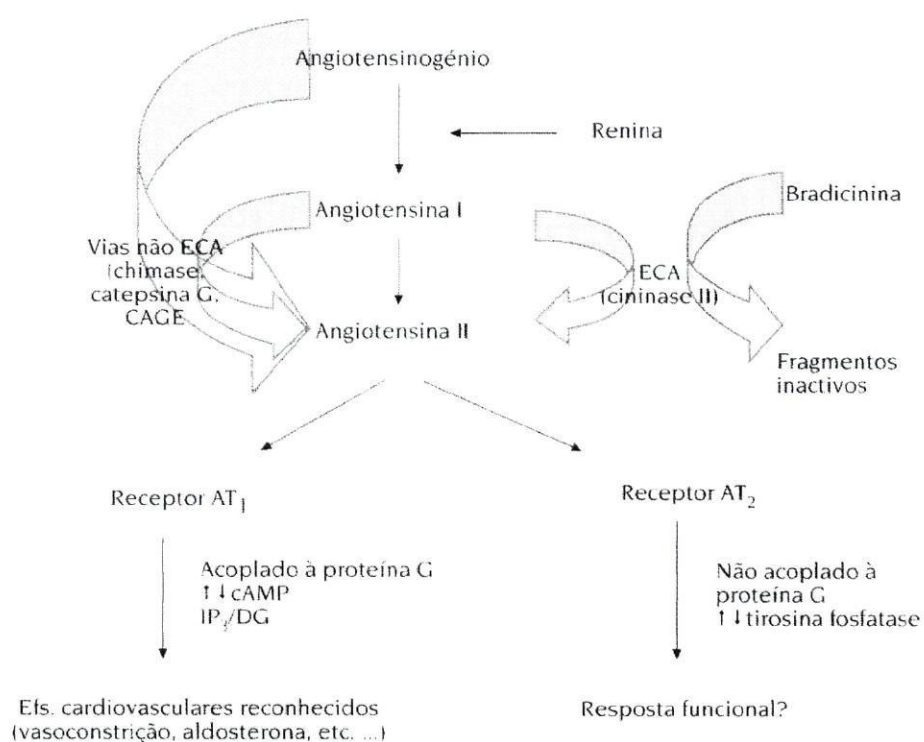
Contudo o papel da insulina no controlo da tensão arterial não se encontra ainda totalmente esclarecido

#### *Sistema renina-angiotensina*

A renina é uma aspartil proteinase sintetizada em doses elevadas pelas células justaglomerulares que se localizam junto da artéria aferente glomerular, havendo evidência de secreção extra renal na Mulher, nomeadamente na supra-renal, no ovário e na placenta e em animais, sob controlo hormonal e genético. A sua libertação é promovida por vários estímulos como, por exemplo, pela diminuição da perfusão renal,

diminuição do volume intravascular, das catecolaminas circulantes, e também pelo aumento da actividade do sistema nervoso simpático, aumento do estiramento arteriolar e pela própria hipocaliemia e.(7,8,9,10)

A renina actua no angiotensinogénio, originando assim um peptídeo com dez aminoácidos designado angiotensina I. Este peptídeo é por sua vez degradado num composto de oito aminoácidos, a angiotensina II, pela acção da enzima conversora da angiotensina (ECA)(ver Figura 2).



**Figura 2.** Esquema representando as vias de síntese da Angiotensina II (ECA- Enzima Conversora da Angiotensina).

A síntese da angiotensina II é um processo complexo que envolve uma série de precursores peptídicos e enzimas que são codificados por diferentes genes. Para estes genes têm sido descritos vários polimorfismos. Os polimorfismos genéticos correspondem à existência de variantes alélicas para um mesmo gene as quais poderão ou não corresponder a alterações na funcionalidade da proteína codificada por esse gene

A acção da angiotensina estende-se a diferentes tipos de células com funções muito distintas, sendo um potente vasoconstritor das células musculares lisas vasculares e o mais potente estímulo para a libertação de aldosterona pelas glândulas supra-renais.(10,11)

A angiotensina II, enquanto elemento neuro-endócrino primordial do sistema renina-angiotensina, tem sido implicado num conjunto de efeitos fisiológicos e fisiopatológicos intrinsecamente relacionados com o controlo da pressão arterial e com a regulação da homeostasia cardiovascular.

Alguns estudos sugerem ainda que a angiotensina II *in vitro* promove a hipertrofia e expressão de genes como c-fos, factores de crescimento como TGF-B (transforming growth factor) e PDGF (platelet derived growth factor) nos cardiócitos, nas células musculares lisas dos vasos, nas células mesangiais dos glomérulos e nas células dos túbulos proximal renais (ver Quadro 2). Em conjunto, estes factores levam à acumulação de colagénio, por aumento da síntese e inibição da sua degradação. O sistema renina-angiotensina promove ainda a actividade do inibidor do activador do

plasminogénio tecidual (PAI-I), factor que está associado a fenómenos tromboembólicos e por interferência no sistema fibrinolítico, e pode contribuir para o risco de re-estenose em doentes com história de enfarte do miocárdio. Tem sido referido o envolvimento da angiotensina II na estimulação da produção de metaloproteinases de tipo I

**Quadro 2.** Angiotensina II e síntese do colagénio: factores tróficos de crescimento e síntese/ metabolismo do colagénio (adaptado de Brilla e Maisch, 1994).

---

1. Estimulação da síntese do colagénio

- a. *Interleucina I (IL-I)*
- b. *Factor de Necrose Tumoral Alpha (TNF- $\alpha$ )*
- c. *Factor de Crescimento Insulina-like I (IGF-I)*
- d. *Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ )*

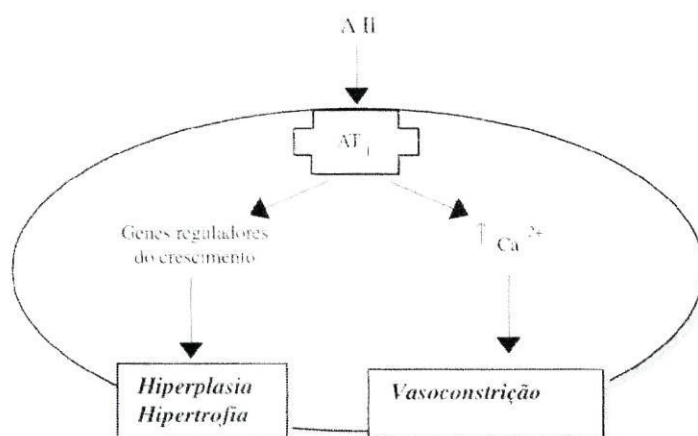
2. Estimulação da produção de metaloproteinases de tipo I

- a. *Interleucina I (IL-I)*
- b. *Factor de Necrose Tumoral Alpha (TNF- $\alpha$ )*

3. Proliferação de fibroblastos

- a. *Factores de Competência*
    - i. *Factor Básico de Crescimento de Fibroblastos (bFGF)*
    - ii. *Factor Activador dos Fibroblastos (FAF)*
    - iii. *Factor de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF)*
  - b. *Factores de Progressão*
    - i. *Factor de Crescimento Insulina-like I (IGF-I)*
    - ii. *Factor de Crescimento Epidérmico (EGF)*
-

Actualmente, estão perfeitamente definidos e caracterizados, no animal e no Homem, dois subtipos diferentes de receptores da angiotensina II. Os receptores AT1, largamente disseminados em vários tecidos, localizam-se preferencialmente no coração, nos vasos e na zona glomerulosa da glândula supra-renal,mas também no rim e cérebro.(10)



**Figura 3.** Activação do receptor AT1 pela Angiotensina II (AII) e sua acção como factor de crescimento (adaptado de Pratt, 1994).

A longo prazo, actuando por via parácrina ou autócrina, via receptores celulares tipo AT 1, a angiotensina II é capaz de estimular o crescimento e/ou proliferação celular de diferentes tipos celulares nomeadamente cardiomiócitos, musculo liso vascular, células mesangiais e fibroblastos, contribuindo, assim, de forma muito significativa para a ocorrência de fenómenos como, hipertrofia e hiperplasia ventricular e vascular, capazes de modificarem e influenciarem negativamente o prognóstico da doença hipertensiva (Figura 3).(10,12)

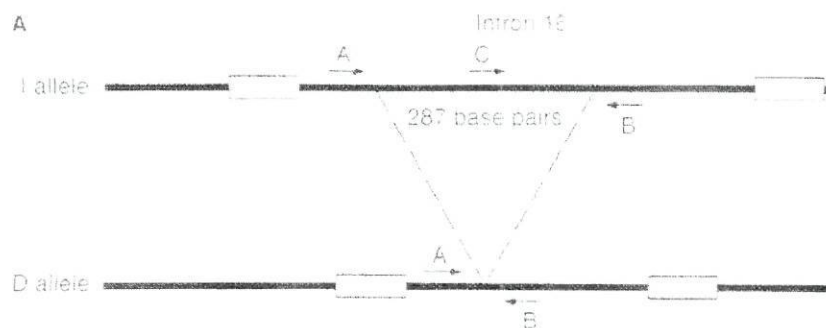
Com uma estrutura molecular diferente do receptor AT1, os receptores AT2 localizam-se principalmente na medula da supra-renal, no rim e no útero e as suas funções fisiológicas têm sido motivo de larga investigação e discussão (Quadro 3). Ainda que, de momento, o seu papel não esteja completamente esclarecido, parece desempenhar acções significativas nos processos de diferenciação e desenvolvimento, regulando fenómenos de apoptose e efeitos potencialmente antiproliferativos. Alguns trabalhos sugerem também que possa estar implicado no controlo da vasodilatação e na regulação do crescimento endotelial e da curva de pressão-natriurese.(11,12,13)

**Quadro 3.** Efeitos fisiológicos mediados pelos receptores da angiotensina AT1 e AT2 (adaptado de Johnstone e Risvanis, 1997).

<b>Receptor AT1</b>	<b>Receptor AT2</b>
<i>Vasoconstrição</i>	<i>Estimulação da apoptose</i>
<i>Estimulação de síntese e secreção da aldosterona</i>	<i>Diferenciação e desenvolvimento embriológico</i>
<i>Reabsorção tubular renal de sódio</i>	<i>Efeitos antiproliferativos</i>
<i>Crescimento hipertrófico cardíaco</i>	<i>Crescimento endotelial</i>
<i>Proliferação do músculo liso vascular</i>	<i>Vasodilatação (via das bradicininas?)</i>
<i>Aumento da actividade simpática central e periférica</i>	<i>Controlo da pressão-natriurese</i>
<i>Estimulação da secreção de vasopressina</i>	
<i>Diminuição do fluxo sanguíneo renal</i>	
<i>Inibição da secreção de renina</i>	

*Polimorfismo do gene codificador da enzima conversora da angiotensina:*

A enzima conversora da angiotensina (ECA), é uma metalopeptidase, distribuída na superfície endotelial e células epiteliais. O gene da ECA humana está localizado no cromossoma 17 (17q23), inclui 21 kb e 26 exões (Figura 4).



**Figura 4.** Representação da inserção (I) e deleção (D) dos alelos do gene humano da enzima conversora da angiotensina (Yoshida et al, 1996).

Foi identificado por Rigat *et al* (14) um polimorfismo no intrão 16 que consiste na presença ou ausência de um fragmento de 287 pares de bases. A presença do fragmento define o alelo I (inserção), enquanto que a sua ausência define o alelo D (deleção). O polimorfismo no gene que codifica a ECA têm associação significativa com os níveis plasmáticos da ECA e também com a actividade da ECA intracelular nos linfócitos T.

O polimorfismo no gene que codifica a ECA tem sido referido como marcador de risco aumentado para enfarte do miocárdio, cardiomiopatia dilatada idiopática, morte súbita na cardiomiopatia hipertrófica, re-estenose após angioplastia percutânea transluminal coronária e hipertrofia ventricular esquerda.. Ao génotipo DD corresponde um aumento significativo da actividade da enzima conversora da angiotensina, contrariamente ao génotipo II, em que há uma menor actividade da enzima, conforme descrito por vários autores.(12,13,14,15,16,17). A associação do génotipo DD com a HTA está descrita, contudo os resultados publicados na literatura não são conclusivos.

No que se refere ao cancro do endométrio, a maior parte dos autores refere a hipertensão como factor de risco. No entanto não existem publicados na literatura dados que expliquem quais os mecanismos biológicos inerentes a esta associação.

Atendendo ao facto de a hipertensão arterial ser um importante problema de Saúde Publica com relevância crescente dado o seu aumento de incidência e ao facto de existir uma eventual associação com o cancro do endométrio também com incidência crescente especialmente no subgrupo de mulheres jovens, algumas delas em fase de procriação, torna-se assim de grande importância a investigação nesta área, como potencial de informação complementar para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

**OBJETIVOS**

**OBJECTIVOS**

Atendendo a que a hipertensão arterial é um dos factores de risco referidos para o carcinoma do endométrio e a activação do sistema renina-angiotensina tem um papel importante no desenvolvimento da hipertensão arterial (HTA), o objectivo do presente estudo é determinar a importância da HTA no desenvolvimento do carcinoma do endométrio investigando a sua correlação com o polimorfismo I/D da enzima conversora da angiotensina (ECA).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local do Estudo**

Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil - Centro Regional do Porto

### **Seleção dos Doentes**

Foi estudado um grupo de 61 doentes com carcinoma do endométrio com a idade média global de  $63,6 \pm 9,5$  anos e com o diagnóstico histológico de adenocarcinoma endometriode (52 casos), carcinoma de células claras (5 casos) e carcinoma seroso (4 casos). A determinação dos estádios foi efectuada de acordo com a Classificação de FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia).

As doentes foram classificadas como hipertensas ou normotensas. Foi considerada a tensão arterial na admissão com base na consulta do processo clínico, tendo sido utilizados os critérios de classificação da hipertensão arterial propostos pela Organização Mundial de Saúde.(5) Considerou-se como hipertensa a doente com valores tensionais iguais ou superiores a 140/90 mmHg respectivamente para a tensão arterial sistólica e diastólica.

### **Análise dos polimorfismos genéticos**

Após colheita de sangue periférico e isolamento das células nucleadas foi efectuada a extração do DNA genómico pela técnica combinada “salting-out-clorofórmio com prévia digestão com Proteinase K.

A análise dos polimorfismos genéticos I/D da ECA foi realizada pela metodologia de amplificação do DNA genómico pela metodologia PCR .A amplificação é feita em simultâneo utilizando um par de oligonucleotídeos para os alelos I e D segundo o protocolo previamente descrito por Rigat *et al.*(14).

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por electroforese em géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e a visualização foi efectuada sob luz ultravioleta.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram armazenados em base de dados e analisados estatisticamente (programa SPSS v 7.5), utilizando os testes estatísticos adequados às variáveis em estudo. Foi efectuada uma análise univariada pelo teste  $\chi^2$ , a comparação de médias pelo teste T de Student ou ANOVA, conforme apropriado.

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

Foram estudados 61 casos de mulheres com Carcinoma do Endométrio. Destas 40 (65,5%) casos apresentavam hipertensão segundo os critérios descritos na secção Materiais e Métodos. Cerca de 89% dos nossos casos de mulheres com hipertensão foram submetidas a tratamento anti-hipertensivo, e que destes, 66% foram tratados com inibidores da ECA (IECA)

O estudo dos polimorfismos genéticos foi realizado num total de 61 amostras de DNA extraído do sangue de mulheres com carcinoma do endométrio (Figura 5 e 6).

O protocolo utilizado com a amplificação do DNA genómico por PCR e posterior análise por electroforese (Figura 6) evidenciou claramente a presença dos genótipos DD, ID e II. A detecção do alelo D é evidenciada pela observação de um produto de PCR de 319 pares de bases. Por outro lado a detecção de um produto de PCR de 597 pares de bases é característica do alelo I.

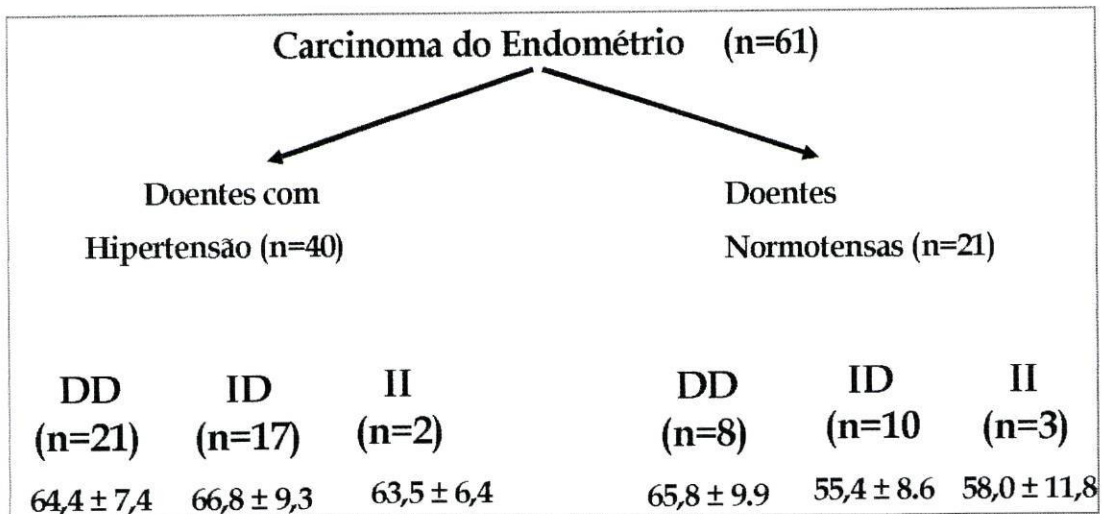
No Quadro 4 são apresentados os resultados obtidos após a genotipagem dos casos estudados em função da presença ou ausência de hipertensão arterial. Os genótipos DD, ID e II estão representados em números absolutos e em percentagem dentro de cada grupo analisado.

**Quadro 4.** Resultados da determinação do polimorfismo I/D do gene que codifica a enzima conversora da angiotensina (ECA) nos casos de mulheres com carcinoma do endométrio analisados.

	N	GENÓTIPO		
		DD	ID	II
Mulheres Hipertensas	40	21 (52,5%)	17 (42,5%)	2 (5,0%)
Mulheres Normotensas	21	8 (38,0%)	10 (47,6%)	3 (14,4%)
Total	61	29 (47,5%)	27 (44,2%)	5 (8,3%)

Foi detectado o genótipo DD em 29 doentes (47,5%), ID em 27 doentes (44,2%) e II em 5 doentes (8,3%) o que corresponde a um total de 122 alelos com uma frequência alélica de 69,6% para o alelo D e 30,4% para o alelo I. As frequências dos genótipos da população em estudo encontra-se de acordo com a distribuição prevista pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p=0,970$ ).

No grupo de 40 (65,5%) doentes com hipertensão arterial, 21 (52,5%) apresentaram o genótipo DD, 17 (42,5%) o genótipo ID e dois (5,0%) casos o genótipo II. Nas doentes sem hipertensão arterial (normotensas), 8 (38,0%) apresentaram o genótipo DD, 10 o genótipo ID(47,6%) e 3 (14,4)o genótipo II.



**Figura 5.** Esquema representando a idade (média±sd) das doentes na altura do diagnóstico e a sua distribuição pelos diferentes genótipos DD, ID e II, e a presença ou não de hipertensão arterial ( $p=0,023$ , Teste ANOVA).

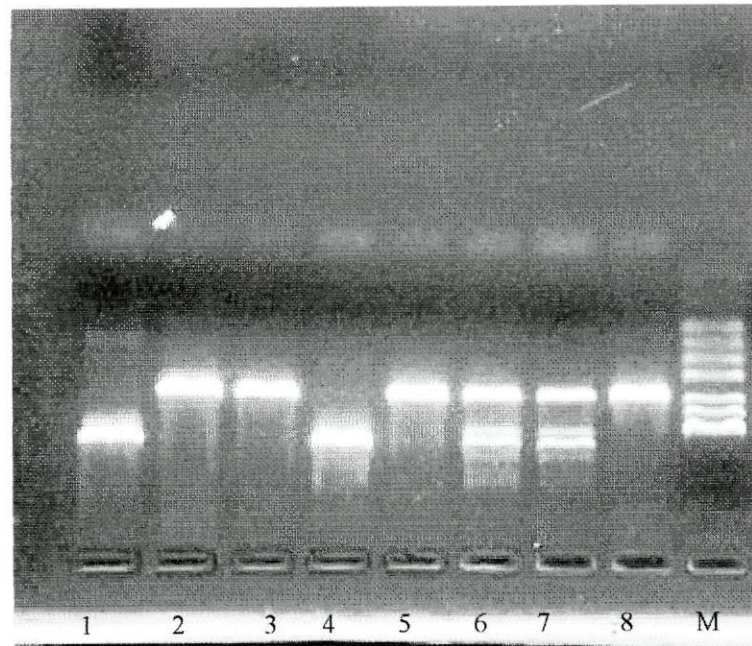
Nas doentes normotensas (sem hipertensão arterial) a presença do alelo I (genótipos ID e II) parece estar associado a uma idade mais precoce de aparecimento de carcinoma do endométrio (idade ± sd: 65,8 ± 9,9 para o genótipo DD; 55,4 ± 8,6 para o genótipo ID; 58,0 ± 11,7 para o genótipo II), enquanto que para o grupo das doentes hipertensas esta relação não foi significativamente diferente (idade ± sd: 64,4 ± 7,4 para o genótipo DD; 66,8 ± 9,3 para o genótipo ID; 63,5 ± 6,4 para o genótipo II) (ver esquema da Figura 5).

No Quadro 5 são apresentados os resultados relativos à associação do Polimorfismo I/D da Enzima Conversora da Angiotensina com as características clinicopatológicas do grupo estudado. Não foram encontradas diferenças

estatisticamente significativas entre a associação dos genótipos DD versus ID/II em função da média das idades ao diagnóstico ( $p=0,426$ ), do estadiamento FIGO ( $p=0,100$ ), com a invasão de um terço externo do miométrio ( $p=0,539$ ) e com o grau de diferenciação ( $p=0,761$ ).

**Quadro 5.** Associação do Polimorfismo I/D da Enzima Conversora da Angiotensina com as características clinicopatológicas do grupo estudado.

	N	GENÓTIPO		P
		DD	ID/II	
<b>Idade</b>	61	62,1 ± 10,1	63,9 ± 9,1	0,426
<b>Estadio</b>				0,100
I/II	48	23 (47,9%)	25 (52,1%)	
III/IV	9	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
<b>Inv. 1/3 Externo do miométrio</b>				0,539
Não	42	21 (50,0%)	21 (50,0%)	
Sim	17	10 (58,8%)	7 (41,2%)	
<b>Grau de diferenciação</b>				0,761
I	14	7 (50,0%)	7 (50,0%)	
II	26	16 (61,5%)	10 (38,5%)	
III	11	7 (63,6%)	6 (36,4%)	



**Figura 5.** Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2,5% corado com Brometo de Etídeo (Visualização sob luz ultravioleta: M- Marcador de DNA; 1,4- genótipo II; 2,3,5,8- genótipo DD; 6,7:-genótipo ID).

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A hipertensão arterial tem sido referida como factor de risco de algumas neoplasias, nomeadamente para o carcinoma da mama e para o carcinoma do endométrio. O mecanismo implicado não é, contudo, conhecido nem existem na literatura muitas hipóteses que tentem explicar esta associação.

No caso concreto do carcinoma do endométrio o sistema renina-angiotensina poderá ter um papel importante. Como já foi atrás referido o tipo de receptores da angiotensina que predominam no endométrio são os AT<sub>2</sub>, responsáveis pela estimulação da apoptose, e também com efeitos antiproliferativos.(10,12)

Dependendo do génotipo determinado pelo polimorfismo do gene codificador da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), poderá haver uma maior actividade enzimática (genótipo DD) ou uma menor (genótipo II) actividade da enzima. Em indivíduos caucasianos, com o genótipo DD, os níveis médios da ECA são cerca de duas vezes superiores relativamente aos indivíduos com genótipo II, apresentando os indivíduos com genótipo ID valores intermédios.(14,16,17)

Os resultados apresentados neste estudo mostram que no grupo de mulheres com carcinoma do endométrio e normotensas existe associação entre a presença do alelo I (genótipos ID e II) e um desenvolvimento mais precoce da neoplasia. A presença deste alelo I está associada a uma idade de  $56,0 \pm 10,1$  anos e a sua ausência a

uma idade de  $65,8 \pm 9,9$  anos sendo esta diferença estatisticamente significativa (ver resultados apresentados no Quadro 6).

**Quadro 6.** Comparação das idades médias com a presença do alelo I e a característica normotensa ou hipertensa em mulheres com carcinoma do endométrio.

		<b>Presença do alelo I</b>	<b>Ausência do alelo I</b>	
	<b>N</b>	<b>(genótipos ID/II)</b>	<b>(genótipo DD)</b>	<b>P</b>
<b>Normotensas</b>	21	$56,0 \pm 10,1$ (n=13)	$65,8 \pm 9,9$ (n=8)	<b>0,029</b>
<b>Hipertensas</b>	40	$66,5 \pm 8,9$ (n=19)	$64,4 \pm 7,4$ (n=21)	0,435

Assim, nos indivíduos com os genótipos II e ID, haverá menor quantidade de angiotensina II circulante com menor estimulação dos receptores AT2 e consequentemente menor actividade apoptótica e menor efeito anti-proliferativo. Em oposição, nos indivíduos com o genótipo DD haverá uma maior produção de angiotensina II e consequentemente uma maior estimulação dos receptores AT2.

Esta associação entre alelo I e neoplasia do endométrio em mulher mais jovem só foi observada em mulheres normotensas. Nas mulheres com hipertensão arterial e carcinoma do endométrio esta associação não foi observada. Uma explicação possível para este facto poderá incluir os aspectos fisiológicos dos receptores da angiotensina

AT1 e AT2 e a complexidade de factores envolvidos na hipertensão arterial. Os efeitos da angiotensina II resultam do equilíbrio existente entre a activação dos receptores AT1 e AT2. A estimulação destes receptores irá activar a MAP quinase (mitogen activated protein) através do receptor AT1 ou inibir esta enzima através do receptor AT2, com efeitos na proliferação celular e na regulação dos mecanismos de apoptose.(7,8,10,12)

Outro factor que poderá condicionar os resultados por nós obtidos em mulheres hipertensas poderá ser o próprio tratamento anti-hipertensivo. Com efeito, o papel dos agentes anti hipertensivos na redução do risco para cancro tem sido descrito. Os trabalhos de Lever et al (18) analisando um estudo de coorte com 1600 doentes em terapêutica anti-hipertensiva com Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (IECA) revelaram uma diminuição do risco para cancro quando em comparação com a população em geral. Os mesmos autores referem que a utilização de inibidores da ECA poderá ser factor de proteção contra o cancro. Outro grupo refere que a inibição da ECA estimula a angiogénese o que poderá ser mais um elo de ligação à oncogénese. (20) Sabendo que 89% dos nossos casos de mulheres com hipertensão foram submetidas a tratamento anti-hipertensivo, e que destes, 66% foram tratados com inibidores da ECA, podemos por a hipótese de este factor ter influenciado o desenvolvimento da neoplasia.

Os nossos resultados indicam assim que a determinação dos genótipos DD, ID, e II nos casos de mulheres com carcinoma do endométrio poderá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na etiopatogénese deste tumor e

eventualmente para o desenvolvimento de protocolos de quimioprevenção em alguns sub-grupos de mulheres com maior risco para cancro.

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- 1- Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Eng J Med* 1996; 335: 640-649.
- 2- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46: 5-27.
- 3- INE, Instituto Nacional de Estatística, 1998
- 4- Barakat RR, Greven K, Muss HB. Endometrial cancer. In: *Cancer Management-Muldidisciplinary Approach, 3th Edition*. Pazdur R, Coia L, Hoskins W, Wagman L, editores, New York: PRR, 1999: 269-286.
- 5- Guidelines Sub-Committee of the World Health Organization-International Society of Hypertension. Guidelines for the management of hypertension. *Blood Pressure* 1999; 8 (Suppl1): 9-43.
- 6- Williams G. Hipertensive vascular disease. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th ed. Fauci AS et al, editores. New York: McGraw-Hill, 1998: 1380-1390.
- 7- Marques da Silva P: Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos antagonistas da angiotensina II. Foco na hipertensão arterial: *Rev. Port. Cardiol.* 1998; 17 (6): 545-555.

8- Munroe PB, Caufield MJ. Genetics of hypertension. *Curr Op Genetics Dev* 2000, 10: 325-329.

9- Pratt RE. Genomics and hypertension: concepts, potentials, and opportunities. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2): 238-47. Review.

10- Pratt RE. Angiotensin II and the control of cardiovascular structure. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jan;10 Suppl 11: S120-8. Review

11- Massie B. Systemic hypertension. In: *Medical Diagnosis and Treatment*, 35th ed. Tierney L, McPhee S, Papadakis M, editores. Londres: Appleton & Lange, 1996: 384-402.

12- Dzau VJ, Mukoyama M, Pratt RE .Molecular biology of angiotensin receptors: target for drug research?. *J Hypertens Suppl* 1994 Jul;12(2):S1-5

13- Julius S. Corcoran Lecture. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension*. 1993 Jun;21(6 Pt 2):886-93.

14- Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F, An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4): 1343-1446.

- 15- Leatham E, Barley J, Redwood S, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) polymorphism in patients presenting with myocardial infarction or unstable angina. *J Hum Hypertens* 1994; 8 (8): 635-638.
- 16- Schunkert H, Hense HV, Holmer S, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1634-8.
- 17- Yoshida H, Kon V, Ichikawa I. Polymorphisms of the renin-angiotensin system genes in progressive renal diseases. *Kidney Int.* 1996; 50: 732-744.
- 18- Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, et al. Do inhibitors of angiotensin I converting enzyme protect against risk of cancer?. *Lancet* 1998; 352 (9123): 179-184.
- 19- Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* 1994 Dec;15 Suppl D:45-52.
- 20- Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner J. Tissue Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* 1999; 99: 343-349.

**ESTUDOS FUTUROS**

## **ESTUDOS FUTUROS**

Os resultados apresentados nesta dissertação despertam-nos o interesse para a continuação do estudo dos mecanismos inerentes à associação da hipertensão arterial como factor de risco para certas neoplasias, nomeadamente o carcinoma do endométrio e o carcinoma da mama. Estamos também conscientes que o trabalho aqui apresentado tem algumas limitações. Por este motivo nos propomos aumentar a amostragem, estudar outras variáveis considerados factores de risco global para doença cardiovascular e o papel destas variáveis na associação da hipertensão arterial e o carcinoma do endométrio. Por outro lado, a comparação com outros modelos neoplásicos permitirá um melhor conhecimento desta associação.

**AGRADECIMIENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

### **A expressão do meu sincero agradecimento:**

À Dra. Deolinda Pereira, pela amizade, incentivo e empenhamento na orientação da realização deste trabalho.

Ao Dr. Rui Medeiros, pela dinamização deste estudo e orientação dos trabalhos laboratoriais.

Ao Dr. Rui e Sousa e à Dra Manuela Sousa do Hospital de S. João pela sua disponibilidade e interesse demonstrado.

Ao Prof. Doutor Guimarães dos Santos, pela realização e dinamização do Mestrado em Oncologia.

Ao Prof. Doutor Fernando Oliveira Torres pelo incentivo e abordagem diferente da biopatologia que em muito contribui para o meu interesse desta área de estudo.

À minha família, pela paciência e acarinamento durante todo o tempo em que decorreu o Mestrado.