

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

HEMOGLOBINA FETAL EM NEOPLASIAS DA INFÂNCIA

FORTALEZA
1992

MÁRCIA LIMA VERDE CAMPOS DE OLIVEIRA

HEMOGLOBINA FETAL EM NEOPLASIAS DA INFÂNCIA

TRABALHO APRESENTADO COMO
REQUISITO FINAL AO VI CUR
SO DE ESPECIALIZAÇÃO EM
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA,
CONVÊNIO UFC-HEMOCE

JUNHO/1992

A G R A D E C I M E N T O S

- ° Dr. José Murilo Martins, um grande mestre, exemplo de de
dicação e competência.
- ° Dras. Anamaria Cavalcante e Silva e Ana Lucia Araújo No
crato, pela oportunidade que me foi dada.
- ° Dra. Francisca Vânia Barreto Ferreira Gomes, sem a qual
o referido trabalho não seria realizado.
- ° Dra. Alana Jocelina Montenegro de Castro, profissional
brilhante, experiente, e amiga.
- ° Aos meus pais, por tudo quanto representam em minha for
mação.
- ° À minha família, Luciano, Roberta, Leopoldo, Newton, Lu
ciana e Eduardo pelo amor e compreensão durante o decor-
rer do curso.

RESUMO

Dosagens de hemoglobina fetal em hemolisados de sangue periférico foram realizadas em 40 crianças com neoplasias hematológicas (leucemias agudas, crônicas e linfomas) e tumores sólidos (nefroblastoma, neuroblastoma, Rhabdomyosarcoma e retinoblastoma).

Os níveis encontrados foram comparados com um grupo de 10 crianças saudáveis e sem antecedentes de patologias hematológicas.

Os achados foram estatisticamente significantes pois em 75% os valores encontrados foram superiores à média da normalidade. Somente 01 caso de leucemia mieloide crônica foi estudado tendo sido encontrado o maior percentual: 11%.

Nas leucemias agudas LMA ($6,06 \pm 2,17$) e LLA ($3,90 \pm 3,21$) seguido pelos linfomas, LH ($2,5 \pm 2,12$) e LNH ($2,22 \pm 1,19$), os tumores sólidos ($2,12 \pm 1,82$) foi o grupo de menores níveis.

Estes achados sugerem que pode haver como primeiro evento molecular nas neoplasias hematológicas, uma proliferação de stem cells anormais estimuladas por fatores intrínsecos, no qual o processo normal de diferenciação e maturação não ocorreu, provocando diferentes graus de re-expressão da hemoglobina fetal.

S U M Á R I O

RESUMO.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	05
3. RESULTADOS.....	07
4. DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÃO.....	15
6. SUMMARY.....	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

A hemoglobina fetal (HbF , $\text{Hb}\alpha_2\gamma_2$) é a hemoglobina que predomina durante a vida intra uterina da 8ª a 36ª semana gestacional e permanece em níveis decrescentes até a 3ª e 4ª semanas do período neo-natal, quando atinge os níveis do adulto em torno do 1º ano de vida ($\leq 1,0\%$).

Durante o segundo trimestre de gestação, a produção dos elementos sanguíneos se localiza principalmente nos órgãos viscerais, sobretudo no fígado.

A HbA aparece no sangue em quantidades cada vez maiores, à medida que a MO começa a assumir a sua função hematopoiética, a partir da 16ª 2ª semana gestação, não obstante a coincidência cronológica, a síntese das hemoglobinas A e F não parece estar ligada a sedes anatômicas específicas. THOMAS e col. (26) demonstraram que as células precursoras dos eritrocitos (Stemcells) provenientes do fígado fetal produzem HbA e HbF na mesma proporção como os elementos precursores das hemáceas colhidas simultaneamente da medula óssea.

Estas observações foram confirmadas por ZILLIACUS et OTTELIN (34) através de métodos diferentes.

WOOD e WEATHERAL (33) também demonstraram que as hemoglobinas F e A são sintetizadas na mesma proporção pelas hemáceas provenientes da medula óssea, do fígado e do baço, durante todos os estágios da vida intra-uterina.

Há mais de um século atrás KÖRBER (12) verificou que a hemoglobina do feto e do recém-nascido difere da hemoglobina do adulto; este autor conseguiu demonstrar que a hemoglobina do cordão umbilical resiste à desnaturação mediante soluções ácidas ou alcalinas concentradas, às quais levam a destruição rápida da hemoglobina de um indivíduo adulto.

Acredita-se que as hemoglobinas embriônicas estão restritas em grande parte as linhagens das células primitivas enquanto que a hemoglobina F, A₁ e A₂ são produzidas pelas linhagens de células definitivas.

Na mudança da produção de HbF para HbA, dentro da linhagem definitiva não há evidência que indique a presença de duas populações distintas de células. Os resultados mais consistentes mostram que a liberação de células com aumento da concentração de HbA ocorre gradualmente durante o processo do desenvolvimento do recém-nascido, estabilizando-se entre o 6º e 8º mês de vida (27).

Por outro lado, experimentos realizados em fetos de carneiro tem demonstrado que os precursores eritrocitários sintetizavam maior concentração de Hb fetal que os eritrócitos maduros.

Aumentos da síntese da hemoglobina fetal pode persistir após o período neo-natal em certas desordens genéticas já que sua síntese obedece a um rígido controle envolvendo os genes tipo Alfa ativos do cromossomo 16 e os genes tipo Beta ativos do cromossomo 11.

As principais desordens genéticas congênitas são as hemoglobinopatias; anemia drepanocítica ou de células falciformes, β -talassemias, $\gamma\beta$ -talassemias a persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF), sendo que sua produção pode ser reativada em várias outras desordens adquiridas acompanhadas de deseritropoiese; processos onde ocorrem defeitos na diferenciação e maturação das células da linhagem eritróide, como a síndrome mielodisplásica, a leucemia mielóide crônica juvenil, a anemia refratária com hiperplasia medular, hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), anemia megaloblástica e outros processos adquiridos neoplásicos ou não.

A reativação da síntese da hemoglobina fetal nas neoplasias leucêmicas e outras estaria vinculada também com processos de descontrole genético que facilitam o surgimento de proteínas eritrocitárias embrionária (8).

Nas neoplasias do adulto se tem observado aumento da hemoglobina fetal nas leucemias mielóides e linfóides crônicas, eritroleucemias e linfomas (24,30), Ca de próstata, bexiga e testículos (9,11,17), cisto adeno-carcinoma papilar, seroso e mucinoso (13) e Ca de mama (32).

Nas crianças, a pesquisa dos níveis de Hb fetal tem sido realizada nas leucemias agudas, LMCJ, nos linfomas e outras neoplasias que não envolvem infiltração da medula óssea como apresentação inicial (9,10,15,22,30).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em 40 crianças portadoras de neoplasias diversas, do serviço de Onco-Hematologia do Hospital Infantil Albert Sabin da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

Todas as crianças se encontravam em tratamento quimioterápico e algumas já em remissão completa da doença, com os seguintes diagnósticos: LLA:17; LMA:03; LNH:12; LH:2 e 5 com tumores sólidos. O grupo controle foi formado por 10 crianças escolhidas no acaso, consideradas sãs e sem antecedentes hematológicos ou neoplásicos.

De cada criança foi colhido 5 ml de sangue periférico, utilizando-se seringa da Becton Dickinson Vacutainer systems com anticoagulante EDTA (Na_2) para realização dos seguintes testes: hematimetria e leucometria em contador de células CELM, Modelo CC510; Eletroforese de hemoglobina realizada em gel de Agar Amido, utilizando solução tampão tris EDTA borato pH 8,6 (18); Quantificação da hemoglobina fetal pelo método da desnaturação alcalina de Betke (3).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de distribuição de frequência a uma variável quantitativa e por medidas de variabilidade em torno

da tendência central. O t de Student foi realizado para comparar os valores nos grupos de maior significância. O α foi fixado em 5% (0,05%).

3. R E S U L T A D O S

Os tipos de neoplasias estudados foram LLA:17; LMA:03; LMC:01; LH:02; LNH:12 e tumores sólidos (05)

A faixa etária entre as 40 crianças variou de 1 a 14 anos com média de 5 anos, sendo 20 do sexo masculino e 20 do sexo feminino (Quadro I).

Em 98% das crianças, incluindo o grupo controle, a eletroforese de hemoglobina realizada em Placa de Amido foi AA. Apenas em 1 caso de linfoma não Hodgkin foi encontrado uma hemoglobina anormal, ou seja, traço falcêmico AS. Tal resultado, foi confirmado pelo teste de solubilidade, que apresentou positividade, ou seja, houve turvação no tubo teste evidenciando a insolubilidade da hemoglobina S.

A dosagem da HbF apresentou resultados bastante significativos nos grupos de LMA, LLA, LH, LNH e TS.O maior valor obtido foi em um caso de leucemia mielóide crônica que devido ser único não foi utilizado para análise estatística (Quadro II).

Os resultados obtidos, levando-se em conta a idade e sexo não mostraram estar relacionados com alto ou baixo percentual de hemoglobina fetal.

Do mesmo modo, os índices hematimétricos não evidenciaram correlação com a dosagem da hemoglobina F entre os diversos grupos (Quadro III).

Comparando-se os índices de Hb fetal encontrados entre as leucemias agudas e linfomas nota-se uma diferença significativa ($4,23 \pm 3,13$) e ($2,26 \pm 1,24$), com um t de student de 5,02 e 4,67 respectivamente estatisticamente significativa quando se fixou um α de 0,05% (Quadro IV).

QUADRO I

CLASSIFICAÇÃO DAS CRIANÇAS SEGUNDO NEOPLASIA, SEXO E IDADE

TIPO DE NEOPLASIA	TOTAL	SEXO		$\bar{X} \pm$ IDADE (ANOS) DE (INTERVALO)
		M	F	
Leucemia Linfoide Aguda	17	04	13	$6,3 \pm 2,93$ (2 - 14)
Leucemia Mieloide Aguda	03	01	02	$3,3 \pm 2,08$ (1 - 5)
Leucemia Mieloide Crônica	01	01	00	1,0 (1,0)
Linfoma de Hodgkin	02	02	00	$9,0 \pm 2,82$ (7 - 11)
Linfoma não Hodgkin	12	10	02	$6,5 \pm 2,96$ (4 - 14)
Tumores Sólidos	05	02	03	$5,4 \pm 2,79$ (3 - 10)
Rabdmiossarcoma (01)				
Tumor de Wilms (02)				
Retinoblastoma (01)				
Neuroblastoma (01)				
Controle	10	06	04	$5,9 \pm 2,18$ (4 - 10)

QUADRO II

G R U P O	HbF (%)	Amplitude
LMA	$\bar{X} = 6,06$ (4,1 - 8,4)	
	S = 2,17	
	n = 03	
	t = 4,26	
LLA	$\bar{X} = 3,90$ (0 - 9,0)	
	S = 3,21	
	n = 17	
	t = 4,09	
LMC	$\bar{X} = 11$	
	n = 1	
LNH	$\bar{X} = 2,22$ (0 - 4,0)	
	S = 1,19	
	n = 12	
	t = 4,39	
LH	$\bar{X} = 2,5$ (1,0 - 4,0)	
	S = 2,12	
	n = 2	
TS	$\bar{X} = 2,12$ (0,0 - 4,7)	
	S = 1,82	
	n = 5	
Controle	$\bar{X} = 0,71$ (0 - 1,2)	
	S = 0,38	
	n = 10	

QUADRO III

VALORES HEMATIMÉTRICOS		$h \times 10^6/l$	hb(g/dl)	ht %	CHCM g/dl
LLA	$\bar{X}$	3,84	11,38	35,23	32,27
	&	2,24	1,92	5,77	0,86
	n = 17				
LMA	$\bar{X}$	33,06	11,40	35,33	32,23
	&	52,61	0,87	2,88	0,37
	n = 3				
LMC	$\bar{X} =$	120,0	8,90	28,00	31,70
	&				
	n = 1				
LNH	$\bar{X}$	15,34	11,57	36,33	31,81
	&	36,18	0,96	2,80	0,95
	n = 12				
LH	$\bar{X}$	6,8	10,05	33,50	29,30
	&	0,56	4,31	9,19	4,80
	n = 02				
TS	$\bar{X}$	6,22	10,88	34,00	31,92
	&	2,65	1,41	3,93	0,70
	n = 05				
Controle	$\bar{X}$	7,76	11,66	36,00	32,40
	&	2,29	1,25	3,94	1,12
	n = 10				

QUADRO IV
VALORES COMPARATIVOS DE HbF ENTRE LEUCEMIAS E LINFOMAS

	HbF %	
	$\bar{X} \pm DE$	
Leucemias (20)	$4,23 \pm 3,13$	$t = 5,02$
Linfomas (14)	$(2,26 \pm 1,24)$	$t = 4,67$
Controle (10)	$(0,71 \pm 0,38)$	

4. D I S C U S S Ã O

Os resultados obtidos no presente estudo, confir
mam prévias observações de que em muitas formas de leuce
mias, elevados níveis de hemoglobina fetal podem ser encon-
trados em alguns estágios da doença (1,2,16,19,28,29).

SHUSTER et al (25) descreveram um paciente com al
to nível de HbF que inicialmente apresentou medula óssea
com hiperplasia eritroide e algumas formas megaloblastoides.
Estas formas foram resistentes a terapia com ácido fólico.
Mais tarde o paciente foi diagnosticado como tendo leucemia
mielocítica.

Vários estudos também tem mostrado elevados níveis
de HbF na gravidez normal e na mola hidatiforme (5,23). Em
compensação LEE (14), observou que menos que 40% dos pacien-
tes com mola hidatiforme tinham HbF com níveis maiores do
que os observados durante uma gravidez normal.

Uma variedade de proteínas embriônicas foi demon
trada em homogeizado de tumores de adultos com adenocarcinoo
ma de colon, carcinoma de pâncreas (4), carcinoma hepatocel
lular e nefroblastoma (31). Um antígeno oncofetal foi tam-
bém descrito em pacientes com carcinoma diversos(7).

NICHOLAS et al (20) relataram que em pacientes com tumor de testículo em recidiva, níveis elevados de uma substância tumor derivada poderia reativar a síntese de HbF. Situação semelhante pode ocorrer em pacientes com outras neoplasias de células germinativas.

Para alguns autores, elevados níveis de hemoglobina F foram encontrados em adultos e crianças com LLA e LMA embora não consistisse padrão real para relacioná-los ao estadiamento da doença ou do tratamento.

Segundo SHERIDAN et al (24) estudando alguns pacientes com mesma neoplasia leucêmica, observou uma elevação da hemoglobina fetal durante a fase de recuperação da medula óssea, por aplasia induzida por drogas.

Na maioria dos pacientes os níveis tendiam a normalizar com a continuação da eritropoiese normal e permanência dos mesmos em remissão. O mesmo fenômeno foi observado por WALKER & ALI (28).

No nosso trabalho, das 17 crianças com leucemia linfóide aguda, 10 se encontram em remissão completa há mais de 18 meses, sendo que, 80% destas continuam apresentando níveis elevados de HbF (1,5 - 9,1%) e 20% com níveis dentro dos padrões normais (0,6 - 1,0%).

Nos 3 casos de leucemia mieloide aguda, 2 estão em 2ª remissão com níveis de 5,6 e 4,1% e o outro caso ainda em início de esquema de indução com HbF = 8,3%.

No grupo dos linfomas não Hodgkin (linfocítico, linfoblástico e Burkitt) não houve diferenças que pudessem evidenciar alguma tendência maior de elevação em determinado tipo histológico, já que somente um caso dos doze estudados era de linfoma leucemizado em recidiva, por abandono de tratamento, este mostrou um nível próximo ao normal fugindo um pouco do esperado devido a invasão da medula óssea por células linfomatosas.

Nos tumores sólidos, houve uma maior aproximação com o grupo controle e somente em 20% dos casos apresentou valores superiores a média.

5. CONCLUSÃO

Realizamos o presente trabalho com a finalidade de conhecer os níveis de elevação da hemoglobina fetal nas diversas neoplasias da infância.

Tentar relacionar esta elevação com os índices hematiméticos (hb; ht e leucometria).

Correlacionar o tipo de neoplasia com maior ou menor elevação do seu nível (com invasão ou não da medula óssea) em diversas etapas da doença.

Concluimos então que: as leucemias (agudas) apresentaram uma elevação bastante significativa não obstante a fase de evolução da doença em que se encontravam, a leucemia crônica (LMC) não pode ser avaliada devido a um único caso estudado, confirmando apenas os resultados da literatura onde a maior elevação da hemoglobina fetal estaria associada a reversão do padrão proteína fetal das células eritroides.

O grupo dos tumores sólidos mostrou os níveis mais baixos sem diferença significativa com o grupo controle, sugerindo que existem componentes inerentes a neoplasia que favorecem ou não a re-expressão da hemoglobina fetal e que a proliferação clonal de células neoplásicas poderia ser a origem da re-expressão do HbF devido ao dano da medula óssea ou se haveria uma lesão cromossomial nas "stem clls" já adultas.

6. S U M M A R Y

In the present study we analysed the rate of HbF in forty children with different malignancies.

The cases were distributed into 17 with acute lymphoblastic leukemia, 03 with acute myelogenous leukemia, 12 cases of non-Hodgkin lymphoma, 02 cases of Hodgkin's lymphoma and 05 of different solid tumors.

Our results have shown an increase of HbF on leukemias followed by lymphomas and solid tumors.

These findings suggest that some factors intrinsic to the neoplasm might favour in a different degree, the re-expression of HbF, which, in turn, would not necessarily mean a reversion to the foetal stages.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTOLOZZI, G. & MARIANELLI, L. Estimation of foetal haemoglobin in leukemia. Acta Haematologica, 35, 214, 1966.
2. BEAVEN, G.H.; ELLIS, M.J. & WHITE, J.C. Studies on human foetal haemoglobin. II. Foetal haemoglobin levels in healthy children and adults and in certain haematological disorders. Brit. J. of Haemat, 6, 201, 1960.
3. BETKE, K; MARTI, H.R.; SCHLICHT I. Estimation of a Small percentage of faetal haemoglobin. Nature, 184, 1877-1878, 1959.
4. BONWO, O. et al. New oncofetal antigen for human pancreas. Lancet I: 643-645, 1974.
5. BROMBERG, Y.M.; SALZHERGER, M. & ABRAHAMON, A. Alkali resistant type of hemoglobin in women with molar pregnancy. Blood, 12:1122-1124, 1957.
6. DAINICK, N; HOFFMAN, R. Hemoglobin F production in testicular malignancy. Cancer 45:2177-2180, 1980.
7. FRITSCHÉ, R. & MACH, J.P. Identification of a new oncofetal antigen associated with several types of carcinomas. Nature 258, 734-737, 1975.

8. GROSEFFI, O.N. et al. Activacion T eritrocitaria, debilitamento de grupo sanguíneo A y aumento de hemoglobina fetal en um síndrome mielo displasico com evolucion a eritroleucemia. Sangre 36 (2): 129-134, 1991.
9. HARDISTY, R. M. et al. Granulogtic leukaemia in childhood. Br. J. Haematology, 10:551-566, 1964.
10. HORTON, B.F.; CHERMOLD, A.L. et al. The hemoglobin profile and erytroleukemia. Câncer, 26, 904-910, 1970.
11. KELLEN, J.A.; BUSH, R.S.; MALKIN, A. Alkali - resistant haemoglobin (HbF) in câncer patients. Câncer, 45:1448-1450, 1980.
12. KÖRBER, E. Cited by Bischoff, H. Inaugural dissertations. Dorpat, Ztschr. Exp. Med. 48:472, 1926.
13. KRAUSS, J.S. et al. Erithroleukemia with high fetal hemoglobin after therapy for ovarian carcinoma. Am J Clin Pathol, 76, 721-722, 1981.
14. LEE, J.C. Fetal hemoglobin in women with hydatiform molar pregnancy. In cellular and molecular regulation of Hemoglobin Switching. G. Stamatoyannopoulos and A.W. Nienhis, Eds. New York. Grune and Stratton, 133-136, 1979.
15. MAURER, H.S. et al. Similarities of the erythrocytes in Juvenile chronic mielogenous leukemia to fetal erythrocytes. Blood. 39, 778-784, 1972.

16. MILLER, D.R. Raised foetal haemoglobin in childhood leukemia. Brit. J. of Hematology, 17, 103, 1969.
17. MUDERRISOGLU, C. et al. Haemoglobin. F. levels in urogenital cancers. Br. J. Urology, 55, 264-267, 1983.
18. NAOUM, P.C. Diagnóstico das hemoglobinopatias. São Paulo, Sarvier, 1987, pg. 170-171.
19. NEWMAN, D.R. et al. Studies on the diagnostic significance of hemoglobin F. levels. Mayo Clinic Proceedings, 48, 199, 1973.
20. NICHOLAS, Lainiak, M. RONALD HOFFMAN. M.D. Hemoglobin F production in testicular malignancy. Câncer 45, 2177-2180, 1980.
21. OZSOYLU, S. & BALCI, S. Fetal hemoglobin in various forms of childhood leukemia: relation to relapse and remission. Clinical Paediatrics, 9, 152, 1970.
22. PAGNIER, J.; LLPEZ, N. et al. An unusual case of leukemia with high fetal hemoglobin: demonstration of abnormal hemoglobins synthesis localized in a red cell clone. Blood, 50:249-258, 1977.
23. PEMBREY, M.E. Weatherall, D.G. & CLEGG. J.B.: Maternal Synthesis of hemoglobin F in Pregnancy. Lancet J: 1350-1354, 1973.
24. SHERIDAN, B.L.; WEATHERALL, D.J. et al. The patterns of foetal haemoglobin production in Leukaemia. Br. J. Haematology, 32. 487-506, 1976.

25. SHUSTER, S.; JONES, J.H. et al. Leukaemia and foetal haemoglobin: a case study. Brit. Med. Journal; 2, 1556 - 1558, 1960.
26. THOMAS, E.D. et al. In vitro synthesis of foetal and adult haemoglobin by foetal haematopoietic tissues. Nature: 185:396, 1960.
27. TH. Papayannopoulou, E. Vichinsky & G. Stamatoyannopoulos. Brit. J. of Haematology, 44, 535-546, 1980.
28. WALKER, I. R. & ALI, M.A.M.: Hemoglobin abnormalities in Neoplastic hematological disorders. Canadian Medical Association Journal, 108, 843, 1973.
29. WEATHERALL, D.J. & WALKER, S. Changes in the chromosome and haemoglobin patterns in a patient with erythroleukemia.. Journal of Medical genetics, 2, 212, 1963.
30. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. et al. Foetal erythropoiesis in human leukemia. Nature: 257:710-712, 1975.
31. WISE, K.S.; ALLENTON, S.E. et al. A fetuinlike antigen from human nephroblastoma. Int.J. Cancer 16: 199 - 210, 1975.
32. WOLK, M. Kieselstein, M. et al. evaluation of fetal hemoglobin in various malignancies with reference to the patient's age. Tumor Biology, 9, 95-100, 1988.
33. WOOD, W.G. & WEATHERALL, D.J. Haemoglobin Synthesis during human foetal development. Nature 244:162, 1973.

34. ZULLIACUS, H. & OTTELIN, A.M. Hemoglobins in the blood of human embryos. Biol. Neonatal, 11:389, 1967.