



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**VELOCIDADE DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL EM CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES COM DOENÇA FALCIFORME EM SALVADOR, BAHIA**

**BARTHOLOMEW FRIDAY CHUKWU**

**Salvador – Bahia  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**VELOCIDADE DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL EM CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES COM DOENÇA FALCIFORME EM SALVADOR, BAHIA**

**BARTHOLOMEW FRIDAY CHUKWU**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Isa Lyra Menezes

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Patologia Humana  
para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia  
2017**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

(FAPESB)

(CNPq)

## **DEDICATÓRIA**

A minha família adorável e aos pacientes com doença falciforme

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer os todos que me deram suporte e contribuíram para o sucesso desse programa, especialmente:

A Deus todo poderoso que me deu a vida e fortaleza por esse periodo;

A minha família pela oração e sacrificio em minha ausência;

A minha orientadora, Professora Marilda de Souza Gonçalves;

A minha co-orientadora, Dra. Isa Menezes Lyra;

Ao Professor Kunle Adekile, por ter me selecionando para fazer o programa e seus conselhos;

A Universidade Federal da Bahia (UFBA);

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bahia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

A Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro;

A minha instituição primeira, University of Nigeria, Nsukka;

Meu orientador para Doppler transcraniano, Dr. Thiago Fukuda;

Ao Dr. Camilo Vieira, que me introduziu ao Doppler transcraniano;

O grupo de Hemoglobinopatia da FIOCRUZ.

Muito obrigado!

CHUKWU, Bartholomew Friday. Velocidade de fluxo sanguíneo cerebral em crianças e adolescentes com doença falciforme em Salvador, Bahia. 101 f. il. 30cm. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A doença falciforme (DF) é caracterizada por complicações agudas e crônicas. Entre as agudas podemos citar: episódios álgicos, síndrome torácica aguda (STA), priapismo, crise hemolítica, infecções agudas e acidente vascular cerebral (AVC), sendo este último responsável por complicações a longo prazo na infância. A velocidade do fluxo sanguíneo cerebral (VFSC) elevada é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do AVC em crianças com anemia falciforme. A identificação de pacientes de risco associados a velocidades de fluxo sanguíneos cerebrais anormais é realizada pelo Doppler transcraniano (DTC), exame fundamental à prevenção primária do AVC. **OBJETIVOS:** Avaliar as velocidades de fluxo sanguíneo cerebral em crianças e adolescentes com DF em Salvador-Bahia, para identificar aqueles com risco alto de AVC, além de correlacionar as velocidades de fluxo cerebral com os perfis clínico e hematológico dos pacientes. **PACIENTES E MÉTODOS:** O DTC por insonação, utilizando uma sonda de 2 MHz, foi realizado em crianças e adolescentes de 2 a 16 anos que preencheram os critérios de inclusão. A saturação de oxigênio e os parâmetros antropométricos foram medidos e os perfis clínico e hematológico foram obtidos dos prontuários de cada paciente. **RESULTADOS:** Cento e trinta e cinco pacientes foram recrutados para o estudo. A mediana geral da velocidade média máxima (VMMA) foi de 125cm/s: o normal sendo que 70-169cm/s. Pacientes com anemia falciforme (HbSS; AF) apresentaram velocidades significativamente maior (131cm/s) que aqueles com HbSC (107cm/s). Apenas um (0,74%) paciente apresentou a velocidade anormal ( $\geq 200$ cm/s) e 18 (13,33%) apresentaram velocidade condicional (170-199cm/s). As velocidades correlacionaram-se inversamente com a saturação de oxigênio, concentração de hemoglobina e idade do paciente, e positivamente com a contagem de leucócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas. A contagem de leucócitos, neutrófilos, monócitos e a concentração de hemoglobina fetal (HbF), e idade do paciente, apresentaram associação linear com a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, enquanto outras variáveis foram mantidas constantes. Os pacientes que apresentaram história pregressa de STA e eventos dolorosos recorrentes apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de velocidades de DTC alteradas. **CONCLUSÃO:** A frequência de VFSC anormal em crianças e adolescentes com DF em Salvador-Bahia foi baixa. As crianças mais jovens e aquelas com AF apresentaram VFSC mais elevadas e risco maior para o desenvolvimento de velocidades alteradas. A presença de saturação de oxigênio e concentração de hemoglobina diminuídas e leucometria e contagem de plaquetas elevadas estiveram associadas as velocidades de fluxo sanguíneo cerebral mais elevadas ao serem estimadas pelo DTC.

**Palavras-chave:** Doença Falciforme, Doppler Transcraniano, Crianças, Adolescentes, Salvador.

CHUKWU, Bartholomew Friday. Cerebral blood flow velocity in children and adolescents with sickle cell disease in Salvador, Bahia. 101 f. il. 30cm. Dissertation (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Sickle cell disease (SCD) is characterized by acute episodes of illnesses (crises) such as bone pain crisis, acute chest syndrome (ACS), priapism, hemolytic crisis, acute infections; and acute and long term complications such as cerebrovascular accident (CVA). Abnormally high cerebral blood flow velocity is the most important risk factor for development of stroke in pediatric patients with sickle cell anemia, and its detection by transcranial Doppler (TCD) is fundamental in primary stroke prevention. Other clinical, hematologic and genetic risk factors of stroke have also been identified. **OBJECTIVES:** The study aimed at evaluating the cerebral blood flow velocities of children and adolescents with SCD in Salvador, Brazil, detect those at high risk of stroke and correlate the flow velocities with clinical and hematological profiles of the patients. **PATIENTS AND METHODS:** Transcranial Doppler was performed on subjects aged 2 to 16 years who fulfilled the inclusion criteria, using a 2 MHz probe placed over the transtemporal windows. The oxygen saturation and anthropometric parameters were measured, and clinical and hematological profiles extracted from their medical records. **RESULTS:** One hundred and thirty-five patients were recruited in the study. The median of timed averaged mean of maximum velocities (TAMMV) was 125cm/s. Patients with sickle cell anemia (SCA) had a significantly higher cerebral blood flow velocity (131cm/s) than those with HbSC disease (107cm/s). Only one (0.74%) patient had abnormal cerebral blood flow velocity (CBFV) while 18 (13.33%) had conditional velocities. CBFV correlated inversely with oxygen saturation, hemoglobin concentration and patient's age while correlated positively with total white blood cells (WBC), neutrophil, monocyte and platelet counts. Total WBC, neutrophil, monocyte and fetal hemoglobin (HbF) and patient's age independently had linear association with CBFV when other variables were kept constant. Previous history of ACS and recurrent painful crises increased the risk of development of abnormal or conditional velocity. **CONCLUSION:** Frequency of abnormal cerebral blood flow velocity among children and adolescents with SCD in Salvador was low. Younger children and those with SCA generally had higher TCD velocities and higher risk of developing abnormal TCD result. Low oxygen saturation, low hemoglobin and high WBC and platelet counts were associated with high TCD velocities. Previous history of ACS and recurrent bone pain were associated with increased risk of having abnormal or conditional TCD velocity.

**Key words:** Sickle Cell Disease, Transcranial Doppler, Children, Adolescents, Salvador.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos resultados de DTC, tendo como base os resultados do estudo <i>Stroke Prevention in Sickle Cell Disease (STOP)</i> .....	39
Tabela 2. Características dos pacientes com doença falciforme. ....	42
Tabela 3. Parâmetros antropométricos dos pacientes com doença falciforme submetidos ao DTC .....	42
Tabela 4: velocidades de fluxo sanguíneo cerebral de crianças e adolescentes com DF em relação aos seus genótipos.....	45
Tabela 5. Resultados do DTC das crianças com DF de acordo com genótipo.....	45
Tabela 6: Resultados de DTC de acordo com a idade dos pacientes com doença falciforme.....	46
Tabela 7. Variáveis hematológicas e SpO <sub>2</sub> de acordo com o resultado do DTC dos pacientes com doença falciforme.....	50
Tabela 8. Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e os índices hematológicos e SpO <sub>2</sub> dos pacientes. ....	54
Tabela 9. Análise de regressão linear múltipla entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e seus preditores independentes.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência de heterozigotos HbAS e prevalência da DF em diferentes estados do Brasil. .....	22
Figura 2. Fisiopatogenia da doença cerebrovascular na doença falciforme. ....	25
Figura 3. Circulação arterial cerebral, aspectos anatômicos (Adaptado de SCHUENKE et al., 2016). ....	28
Figura 4. Angiografia mostrando o curso da artéria carótida interna intracraniana (Adaptado de FRANK GAILLARD, 2008). ....	30
Figura 5. Os princípios técnicos do Doppler transcraniano (Adaptado de Thrush, 2005). ....	31
Figura 6. Transmissão de ondas pulsáteis de ultrassom através do crânio usando a sonda setorial Doppler pulsada com frequência de emissão de 2,0 MHz. A sonda está posicionada na janela temporal. Painel direito = Círculo de Willis (Adaptado de D'ADREA et al., 2016). ....	32
Figura 7. Resultados de DTC dos pacientes com doença falciforme investigados. ....	43
Figura 8. Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes com base no sexo. ....	44
Figura 9. Velocidades do fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes de acordo com o genótipo da doença falciforme. ....	44
Figura 10. Velocidade de fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes com doença falciforme de acordo com o uso ou não de hidroxiuréia. ....	47
Figura 11. Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral com base na idade do paciente. ....	47
Figura 12. Correlação entre a velocidade de DTC e a idade dos pacientes com doença falciforme. .....	47
Figura 13. Comparação de VM MAX pela direita e esquerda em artérias cerebrais média entre os diferentes genótipos da DF. ....	48
Figura 14. Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral observada ao DTC e saturação de oxigênio. ....	50
Figura 15. Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes com doença falciforme e o hematócrito. ....	51

Figura 16. Correlação entre a Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e a contagem de reticulócitos.....	51
Figura 17. Representação gráfica da correlação entre VMMAx e a contagem total de leucócitos. ....	52
Figura 18. Representação gráfica da correlação entre VMMAx e contagem absoluta de monócitos. ....	52
Figura 19. Representação gráfica da correlação entre VMMAx e contagem absoluta de neutrófilos. ....	53
Figura 20. Curva de correlação entre VMMAx e contagem de plaquetas.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACA:	artéria cerebral anterior
ACI:	artéria cerebral interna
ACM:	artéria cerebral média
ACP:	artéria cerebral posterior
ACS:	<i>acute chest syndrome</i>
AF:	anemia falciforme
AVC:	acidente vascular cerebral
CDC:	<i>Center for Disease Control</i>
CVA:	<i>cerebrovascular accident</i>
DF:	doença falciforme
DTC:	doppler transcraniano
EUA:	Estados Unidos America
FDA:	<i>Food and drug Administration</i>
GM-CSF:	fator de crescimento granulocito monócito
HbF:	hemoglobina fetal
HbS $\beta$ -tal:	hemoglobina S beta talassemia
IC:	intervalo de confiança
IMC:	índice de massa corporal
IL:	interleucina
NO:	óxido nítrico
PGE:	prostaglandina E
SCA:	<i>sickle cell anemia</i>
SCD:	<i>sickle cell disease</i>
STA:	síndrome torácica aguda
TAMMV:	<i>timed average mean of maximum velocity</i>
TCD:	transcranial Doppler
TGF:	taxa de filtração glomerular
TNF:	fator de necrose tumoral

VFSC: velocidade de fluxo sanguíneo cerebral

VMMAX: velocidade médio máxima

$\beta^S$ : alelo beta S

$\beta^A$ : alelo beta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME.....	21
2.2	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NA DOENÇA FALCIFORME.....	22
2.3	FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NA DOENÇA FALCIFORME.....	23
2.4	FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA AVC.....	25
2.5	PREVENÇÃO DO AVC NA DOENÇA FALCIFORME .....	26
2.6	DOPPLER TRANSCRANIANO (DTC).....	27
2.7	SUPRIMENTO SANGUÍNEO CEREBRAL .....	27
2.8	PRINCÍPIOS DO DOPPLER TRANSCRANIANO .....	30
2.9	TÉCNICAS DE DTC .....	31
2.10	TIPOS DE DTC .....	32
2.11	VANTAGENS E DESVANTAGENS DO DTC .....	33
2.12	RECOMENDAÇÕES DO DTC NA DOENÇA FALCIFORME .....	33
2.13	RELAÇÃO ENTRE OS FATORES DE RISCOS CLÍNICOS DE AVC E VALORES DE DTC NA DOENÇA FALCIFORME.....	34
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	35
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
5.1	DESENHO DO ESTUDO .....	37
5.2	LOCAL DO ESTUDO.....	37
5.3	TAMANHO DA AMOSTRA.....	37
5.4	RECRUTAMENTO DE PACIENTES .....	38
5.5	MÉTODOS.....	38
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	41

6.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES.....	41
6.2	TRIAGEM PELO DOPPLER TRANSCRANIANO.....	41
6.3	COMPARAÇÃO DA VELOCIDADE DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL ENTRE OS SEXOS .....	41
6.4	PACIENTES COM AF APRESENTARAM VELOCIDADES DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL MAIS ELEVADAS EM COMPARAÇÃO AOS OUTROS GENÓTIPOS DE DF ESTUDADOS .....	43
6.5	PACIENTES EM USO DA HIDROXIUREIA APRESENTARAM VELOCIDADES DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL COMPARÁVEIS COM AQUELES QUE NÃO A ESTAVAM UTILIZANDO .....	45
6.6	EFEITO DA IDADE SOBRE A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL .....	45
6.7	RELAÇÃO ENTRE A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL E A ANTROPOMETRIA DOS PACIENTES .....	47
6.8	A VM MAX É COMPARÁVEL NOS HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DIREITO E ESQUERDO .....	48
6.9	SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA (SPO <sub>2</sub> ) COMPARADA ENTRE AS CATEGORIAS DE RESULTADO DO DTC .....	48
6.10	CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO, CONTAGEM DE RETICULÓCITOS E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM DIFERENTES RESULTADOS DE DTC.....	49
6.11	ASSOCIAÇÃO ENTRE A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL E A CONTAGEM DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS, MONÓCITOS E PLAQUETAS...51	
6.12	ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA.....	54
6.13	ASSOCIACAO ENTRE SÍNDROME TORÁCICA AGUDA, EPISÓDIOS ÁLGICOS RECORRENTES E PRIAPISMO COM OS VALORES DE DTC ANORMAL OU CONDICIONAL.....	55
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>

**ANEXOS** .....73

## 1. INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma desordem genética comum em todo o mundo, sendo caracterizada pela presença da hemoglobina variante S (HbS), que é decorrente de uma mutação de ponto no sexto códon do gene da globina beta ( $\beta$ ) (HBB). A herança de um alelo  $\beta^S$  da HbS e um alelo  $\beta^A$  da hemoglobina normal (HbA), caracteriza o traço falciforme (HbAS), cujos portadores não apresentam manifestações clínicas; entretanto, a herança de dois alelos  $\beta^S$  ou homozigose (HbSS) é conhecida como anemia falciforme (AF). A herança de um alelo  $\beta^S$  em associação com outros alelos provenientes de hemoglobinas variantes, tais como C, D e E, entre outras, ou de talassemias, como a  $\beta$  talassemia, caracterizam a DF ou heterozigose dupla com a HbS. Por conseguinte, a definição de DF inclui a AF e outras associações da HbS com outras hemoglobinas variantes ou talassemias, como na hemoglobinopatia SC (HbSC), S $\beta$ -talassemia (HbS $\beta$ -tal) e na associação da HbS com a HbD Punjab (HbSD), entre outras (OKPALA, 2010). A AF caracteriza-se pela presença de hemácias em forma de foice no sangue periférico e sintomatologia clínica heterogênea como episódios dolorosos, síndrome torácica aguda, infecções e danos de órgãos crônicas.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 5 % da população mundial possua algum tipo de hemoglobinopatia, principalmente a DF ou talassemia, com distribuição de até 25% em algumas regiões, sendo que, anualmente, mais de trezentos mil (300.000) bebês nascem com distúrbios graves da hemoglobina (WHO, 2011). A DF é comum em regiões tropicais, em especial na África Subsaariana, Oriente Médio e regiões Árabes. No entanto, pode ser encontrada em diferentes países em decorrência da migração de populações, que ocorreu, historicamente, entre indivíduos de ancestralidade africana. Desta forma, a DF está também presente em países como Grécia, Itália, Sicília, Turquia e Índia, bem como na América do Norte, do Sul e Central. Estima-se que a DF esteja presente em cerca de 20-25 milhões de pessoas em todo o mundo; com o nascimento anual de cerca de 240.000 crianças com esta patologia na África subsaariana e óbito de 50-80% destas antes dos cinco anos de idade (MAKANI et al., 2011; AYGUN E ODAME, 2012).

A HbS, quando em estado desoxigenado, é menos solúvel e tende a polimerizar-se e cristalizar-se no interior das hemácias. Estes polímeros alongam-se e precipitam dentro dos eritrócitos, distorcendo a forma normalmente bicôncava, que pode assumir formatos irregulares, incluindo o semelhante a uma foice. Na doença de hemoglobina SC (HbSC), a mutação

proporciona a substituição do ácido glutâmico pela lisina na sexta posição da cadeia da globina beta, com a formação de cristais de hemoglobina C e polímeros de HbS, com a presença de hemácias em alvo e falcizadas (LAWRENCE et al., 1991). Os eritrócitos falcizados podem voltar a sua forma bicôncava em locais onde há melhor oxigenação, como nos pulmões. No entanto, repetidos episódios de falcização podem ocasionar a falcização irreversível das hemácias, que apresentam danos no citoesqueleto da membrana. As hemácias são suscetíveis a hemólise o que resulta em anemia, além de poderem obstruir a microvasculatura, levando a isquemia e dano tecidual (CONRAN et al., 2009; OKUMURA et al., 2013). A hemólise e obstrução vascular com isquemia são os principais processos patológicos na DF.

Embora a DF seja considerada como distúrbio primário das hemácias, os leucócitos, as plaquetas e as células endoteliais são importantes na sua fisiopatogenia. Além disso, fatores humorais, ambientais, celulares e genéticos também possuem papel importante nos mecanismos presentes na DF (OKPALA et al., 2006; MANWANI et al., 2013).

A AF é caracterizada por eventos agudos, com a presença de episódios dolorosos, síndrome torácica aguda (STA), priapismo, crise hemolítica, crise aplástica, susceptibilidade aumentada a infecções e acidente vascular cerebral (AVC), sendo que este último pode levar a sequelas neurológicas importantes. Os eventos crônicos mais comuns são: nefropatia, doença hepática crônica, retinopatia proliferativa, necrose avascular da cabeça femoral e úlcera de membros inferiores, devendo sempre ser rastreados durante o acompanhamento clínico visando uma intervenção adequada. Os achados laboratoriais podem incluir: redução na concentração de hemoglobina, elevação nas concentrações plasmáticas de bilirrubina, aumento na contagem de leucócitos, com neutrofilia relativa no estado estável, aumento na contagem de reticulócitos, presença de hemácias em formato de foice no sangue periférico, bem como marcadores relativos a danos em órgãos específicos.

A DF necessita de controle clínico, sendo o transplante de medula óssea uma opção curativa para um grupo determinado de pacientes. Medidas importantes para esse fim são: o diagnóstico precoce e a educação para a saúde, medidas preventivas precoces, tais como imunizações específicas, uso de profilaxia antimicrobiana, reconhecimento precoce e tratamento dos eventos agudos. O rastreamento de complicações crônicas com avaliações, envolvem o exame oftalmológico anual, ecocardiografia para detetar hipertensão pulmonar, a detecção precoce de nefropatia pela avaliação regular da urina, medição da taxa de filtração glomerular (TFG), testes

para proteinúria e microalbuminúria (OSSEI-YEBOAH & RODRIGUES, 2011; SHATAT et al., 2016); ressonância magnética visando detectar infartos cerebrais silenciosos e estenose vascular cerebral e Doppler transcraniano (DTC), por insonância ou ultrassom, para identificar pacientes com risco de AVC.

A hidroxiuréia (HU) é a única droga utilizada no tratamento da DF, tendo sido aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) e promove melhora na sintomatologia clínica da doença com redução na frequência de eventos agudos, bem como na prevenção e reversão de algumas complicações (SINGH et al., 2010; WANG et al., 2011).

O AVC é uma complicação devastadora da DF, levando a desafios médicos, psicológicos, sociais e econômicos. Até 11% das crianças com DF estão em risco de desenvolver esse evento até 20 anos de idade, sendo a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral elevada, o fator de risco mais importante (OHENE-FREMPONG et al., 1998; KWIATKOWSKI et al., 2006). A detecção de elevação da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral através do DTC é fundamental para a prevenção primária do AVC nessa população como foi demonstrado por ADAMS e cols, que apontou para a redução do risco em mais de 90% pela instituição da terapia transfusional (redução do % HbS) para pacientes com velocidades alteradas (ADAMS et al., 1998).

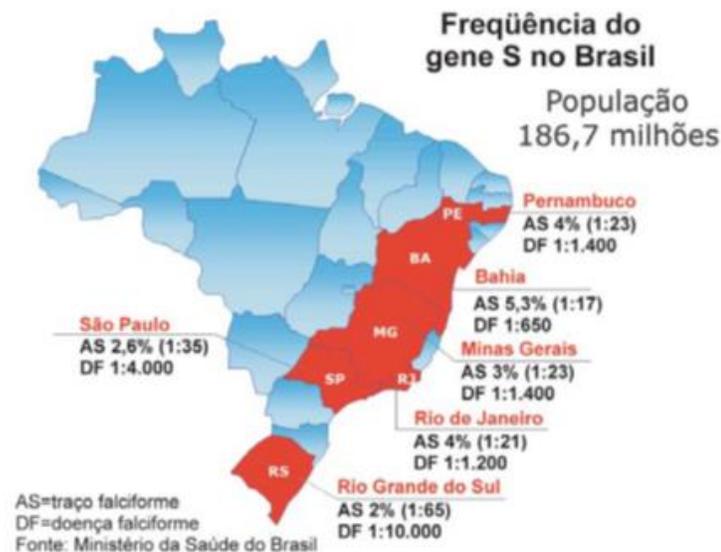
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME

A DF é o transtorno genético mais comum no mundo, com taxas elevadas de morbidade e mortalidade, afetando cerca de 20 a 25 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente as de ascendência africana. Nos Estados Unidos da América, a incidência de traço falciforme é estimada em 15,5 casos por 1.000 nascimentos, muito comum entre os negros do que os brancos. Em 2010, estimava-se que o número total de bebês nascidos com traço falciforme era mais de 60,000 (CDC, 2014). Na Inglaterra, foi estimada a existência de cerca de 240.000 portadores da HbS com mais de 12.500 com a DF, sendo a doença mais prevalente entre as pessoas de ascendência africana e caribenha (NHS, 2006), enquanto na Arábia Saudita, Memish e cols observaram a frequência de 42,4% para os portadores do traço falciforme e a razão de 2,7 para a DF por mil pessoas investigadas (MEMISH et al., 2011). Mais de 75% dos casos de AF são observados na África sub-saariana, com cerca de 50-90% das crianças afetadas indo a óbito antes dos cinco anos de idade (WHO, 2010; GROSSE et al., 2011; PIEL et al., 2013). Em 2006, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou a frequência do traço falciforme em torno de 10% a 40% na África equatorial, reduzindo para 1% a 2% no norte da África e <1% na África do Sul. Essa frequência elevada proporciona resistência contra a malária por *Plasmodium falciparum* durante a primeira infância, resultando na sobrevivência do hospedeiro e subsequente herança do alelo  $\beta^S$  (WHO, 2006). Na Nigéria (África Ocidental), a frequência varia de 1% a 3%, com cerca de 25% de frequência para o traço falciforme (GEORGE et al., 2011), enquanto que o estudo de Okwi e cols, na Uganda (África Oriental), mostrou a frequência de 17,5% e 13,4% para o traço falciforme nas regiões leste e oeste do país, respectivamente. Com relação a prevalência da AF, cerca de 1,7% e 3% das crianças do leste e do oeste do Uganda foram diagnosticados com a doença, respectivamente (OKWI et al., 2010). Comparando com um levantamento anterior da DF realizado em Uganda em 1949 (45% de traço falciforme no oeste e 20% -28% no leste do Uganda) por Lehmann e cols. (LEHMANN et al., 1949), os autores observaram a mudança na frequência do traço falciforme em decorrência de fatores biológicos e sociais, incluindo um possível movimento migratório entre as regiões, o que poderia estar reduzindo a frequência do traço falciforme.

No Brasil, a frequência do traço falciforme e a prevalência da DF variam conforme a região, com relato de frequências de 1,1% a 9,8% para o traço e de 0,8 a 60 por 100.000

nascimentos para a doença. Estima-se que cerca de 700-1000 crianças nascem anualmente com a DF (BEZERRA et al., 2007; LOBO et al., 2011; OKUMURA et al., 2013; SOMMET et al., 2016). Em Salvador, Bahia, Adorno e cols relataram a frequência de 9,8% para os indivíduos HbAS e a prevalência de 0,17% para os HbSS (ADORNO et al., 2005). Isso foi superior a 1,98% e 0,01% relatado por Brandelise e cols. em São Paulo (BRANDELISE et al., 2004). Entre os recém-nascidos do Distrito Federal, Diniz e cols. descreveram a frequência de 3,23% para o traço falciforme e a prevalência de 0,09% para a AF, respectivamente (DINIZ et al., 2009). De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, o estado da Bahia tem a maior frequência do traço falciforme e a maior prevalência da DF com estimativas de 5,3% ou 1:17 e 1 em cada 650 pessoas da população, respectivamente (figura 1). A variação na prevalência dessas fontes pode ser devida a diferenças no tamanho da amostra e no grupo de pessoas com ascendência africana nessas diferentes regiões.



**Figura 1.** Frequência de heterozigotos HbAS e prevalência da DF em diferentes estados do Brasil.

## 2.2. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NA DOENÇA FALCIFORME

O AVC é um evento neurológico agudo com duração superior a 24 horas, sendo uma complicação devastadora que pode levar à mortalidade ou morbidade a longo prazo, com consequente carga social e econômica para o paciente afetado, a família e a comunidade em geral. O AVC ocorre em cerca de 11% das crianças com AF antes dos 20 anos e em cerca de 24% até a

idade de 45 anos (OHENE-FREMPONG et al., 1998). O Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study estimou a incidência de AVC entre crianças com DF em 285 por 100.000 ou 0,28% ao ano (EARLEY et al., 1998), enquanto na Nigéria a prevalência varia de <1,0% a 5,4% (FATUNDE et al., 2005; LAGUNJU et al., 2012; MADU et al., 2014). A variação na incidência ocorre, provavelmente, devido à diferença nos grupos etários estudados e no tamanho da amostra. Um estudo recente realizado em Uganda estimou a prevalência de AVC entre crianças com AF hospitalizadas em 6,8%, o que está próximo de alguns números da Nigéria (MUNUBE et al., 2016). Entre as crianças brasileiras com DF, Rodrigues e cols relataram prevalência de até 17,2%, atingindo até 27,3% entre aqueles com AF (RODRIGUES et al., 2016).

No estudo sobre a história natural do AVC na DF, Powars e cols relataram o pico de incidência em crianças com menos de seis anos com uma taxa de recorrência de 67% se não tratadas, sendo o risco de recorrência maior nos 3 primeiros anos de vida (POWERS et al., 1978). Uma criança com AF é cerca de 300 vezes mais suscetível ao desenvolvimento de AVC do que uma criança saudável (OHENE-FREMPONG et al., 1998). A incidência é menor antes dos dois (2) anos, provavelmente, devido as concentrações elevadas de hemoglobina fetal (HbF) nessa faixa etária. A HbF tem um efeito protetor na falcização dos eritrócitos, uma vez que não participa da polimerização da HbS.

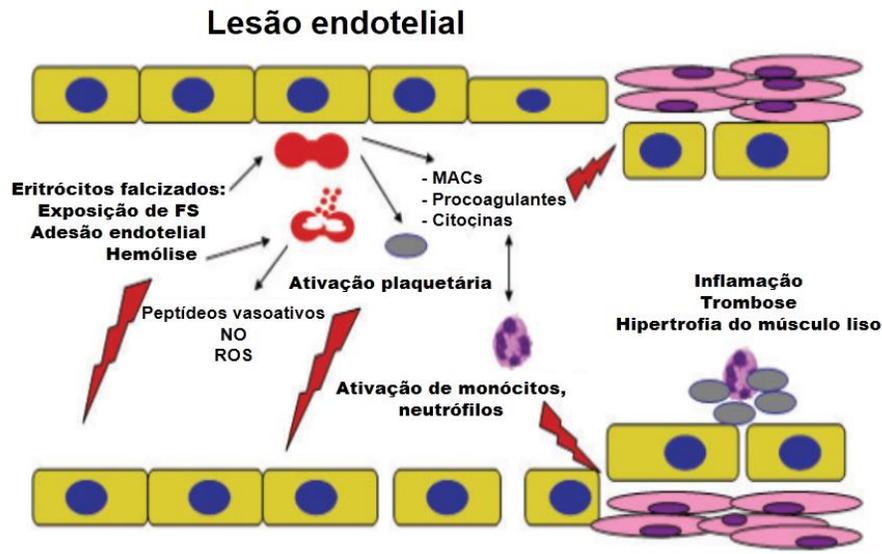
### 2.3. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NA DOENÇA FALCIFORME

AVC ocorre como resultado da interrupção do fornecimento de sangue ao cérebro, quer pela oclusão ou estenose de uma artéria (AVC isquêmico ou infarto), quer pela ruptura de vaso sanguíneo (AVC hemorrágico). Em crianças e adolescentes com AF, o AVC isquêmico é comum e atribuído à proliferação de fibroblastos e músculo liso nas artérias carótida interna distal e proximal média e anterior, resultando no estreitamento da parede vascular (vasculopatia proliferativa) e, conseqüentemente, no aparecimento de anormalidades do fluxo sanguíneo (FASANO et al., 2015). No entanto, a oclusão de grandes artérias por si só não explica todos os AVCs observados em crianças com DF. Microinfartos na substância branca profunda e espessamento arteriolar difuso têm sido relatados em alguns estudos neuropatológicos com angiogramas cerebrais normais em casos de acidente vascular cerebral agudo (GERALD et al., 1980; KOSHY et al., 1990).

A vasculopatia proliferativa é mediada pelo aumento na adesividade dos eritrócitos falciformes, neutrófilos, monócitos, plaquetas e células endoteliais como resultado do aumento da expressão de receptores de moléculas de adesão nas membranas celulares. Estas moléculas de adesão incluem integrinas e selectinas das células sanguíneas e a molécula de adesão celular vascular (VCAM 1) na membrana celular endotelial. A consequência desta adesão celular é a oclusão vascular, lesão de isquemia reperfusão e lesão endotelial; liberação de fator von Willebrand, produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-6, IL-1 $\beta$ , fator de crescimento granulócito monócito (GM-CSF), IL-3, endotelina-1 e prostaglandina E2 (PGE2) (LANARO et al., 2009; SARRAY et al., 2015), e quimiocinas, que são quimioatraentes de leucócitos (WALLACE et al., 2009).

A agregação plaquetária e a atração de granulócitos, monócitos e macrófagos, bem como de outras células inflamatórias para o local de lesão vascular causa lesão de isquemia e reperfusão adicional, resultando em um ciclo vicioso. A lesão de reperfusão/isquemia induz a resposta inflamatória excessiva, a adesão aumentada aos leucócitos; aumento na produção de espécies de radicais oxidantes no endotélio vascular e aumento do tônus vasomotor (KELM et al., 1990; KAUL et al., 2000). A lesão de isquemia-reperfusão recorrente leva à proliferação e hipertrofia de fibroblastos e músculo liso vascular (vasculopatia), resultando em oclusão vascular e / ou estenose com aumento da velocidade do fluxo sanguíneo para compensar a oferta reduzida deste aos tecidos cerebrais.

A depleção de óxido nítrico (NO) devido à hemólise e liberação e metabolismo de hemoglobina extracelular e heme contribuem para a vasoconstrição crônica e a ativação plaquetária. Os eritrócitos falciformes obstruem e reduzem o fluxo sanguíneo com isquemia vascular local e lesão endotelial, promovendo também o ambiente trombogênico (Figura 2) (ATAGA et al., 2009).



**Figura 2.** Fisiopatogenia da doença cerebrovascular na doença falciforme. RBCs, hemácias; PS, fosfatidilserina; CAMs, moléculas de adesão celular; NO, óxido nítrico; ROS, espécies reativas de oxigênio (Adaptado de HOPPE et al., 2005).

#### 2.4. FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA AVC

Vários fatores de risco associados ao desenvolvimento do AVC foram identificados, incluindo a presença de anemia, leucocitose, trombocitose, pressão arterial sistólica elevada, AVC anterior, infartos cerebrais silenciosos, síndrome tóraca aguda (STA) recorrente e saturação arterial de oxigênio baixa (OHENE-FRENPONG et al., 1998). Pessoas do sexo masculino têm risco maior para o desenvolvimento de AVC que as mulheres, enquanto que ter a AF está associado ao risco mais elevado e ter S $\beta$ -talassemia ao risco reduzido (RODRIGUES et al., 2016). Os primeiros estudos de Ohene-Frenpong e cols relataram incidência elevada de AVC em pacientes com AF, sendo que os fatores de risco para AVC foram o ataque isquêmico transitório prévio; concentração diminuída de hemoglobina no estado estável, o aumento de episódios recentes de STA e elevação da pressão arterial sistólica (OHENE-FRENPONG et al., 1998). Em estudo recente, Rodrigues e cols. observaram que a incidência de acidente vascular cerebral foi significativamente maior em pacientes com AF, do sexo masculino, enquanto a co-herança da HbS com talassemia alfa demonstrou ter efeito protetor (RODRIGUES et al., 2016). O risco de acidente vascular cerebral na DF é mais elevado na primeira década de vida, principalmente entre 2 e 5 anos e menos comum antes dos 2 anos de idade (OHENE-FRENPONG et al., 1998), provavelmente, devido ao efeito protetor da HbF.

A natureza frágil das artérias carótidas internas e das artérias cerebrais médias também pode estar associada ao risco elevado de AVC na primeira década de vida. A presença de infartos cerebrais silenciosos na ressonância magnética representa risco 14 vezes maior de desenvolver AVC (MILLER et al., 2001). Em crianças com AF e  $V_{MAX} \geq 200\text{cm/s}$ , o risco de desenvolver AVC é 300 vezes mais quando comparado aos da mesma idade e sexo com velocidade normal (ADAMS et al., 1997). De acordo com o Stroke Prevention Trial realizado em indivíduos com AF (STOP), a  $V_{MAX}$  de 200cm/s ou superior está associada ao risco de 10% para o AVC por ano (ADAMS et al., 1998).

## 2.5. PREVENÇÃO DO AVC NA DOENÇA FALCIFORME

A prevenção do AVC na DF começa com a identificação de pessoas de alto risco. Em crianças com DF, o DTC é utilizado para detectar aqueles com risco alto no período de meses ou anos antes de sua ocorrência. No estudo STOP, foi interessante observar que o tratamento de indivíduos com velocidade de fluxo sanguíneo cerebral de 200cm/s ou mais e em uso de transfusão sanguínea regular reduziu o risco de AVC de 10% para <1% por ano (ADAMS et al., 1998).

A terapia transfusional crônica mensal tem por objetivo reduzir a concentração de HbS no interior das hemácias para menos de 30%. No estudo STOP prolongado, os pacientes com velocidades de DTC de 200cm/s ou mais que estavam em transfusão de sangue crônica eram mais propensos a reverter para velocidades normais ou condicionais do que aqueles em cuidados padrão (LEE et al., 2006). A terapia transfusional crônica, embora muito eficaz na prevenção do AVC primário na DF, está associada a desafios clínicos e logísticos. Efeitos adversos, como reações transfusionais agudas e crônicas e dificuldade de acesso ao sangue, especialmente em países de baixa renda, limitam o uso.

A HU tem sido apontada como terapia alternativa as transfusões crônicas para a prevenção do AVC na AF. Pesquisadores do estudo (TWITCH) observaram que crianças com velocidades anormais de DTC que receberam transfusão de sangue por pelo menos um ano, que foram, posteriormente, divididos em dois grupos, HU e 24 semanas de transfusão contínua, apresentaram resultados comparáveis (WARE et al., 2016). Este estudo validou o uso de HU como possível substituto para transfusão de sangue na prevenção primária do AVC na DF. Zimmerman e cols. também observaram o potencial da HU na redução das velocidades de DTC em pacientes com AF. O grupo observou diminuições significativas nas velocidades de DTC em ambas as artérias

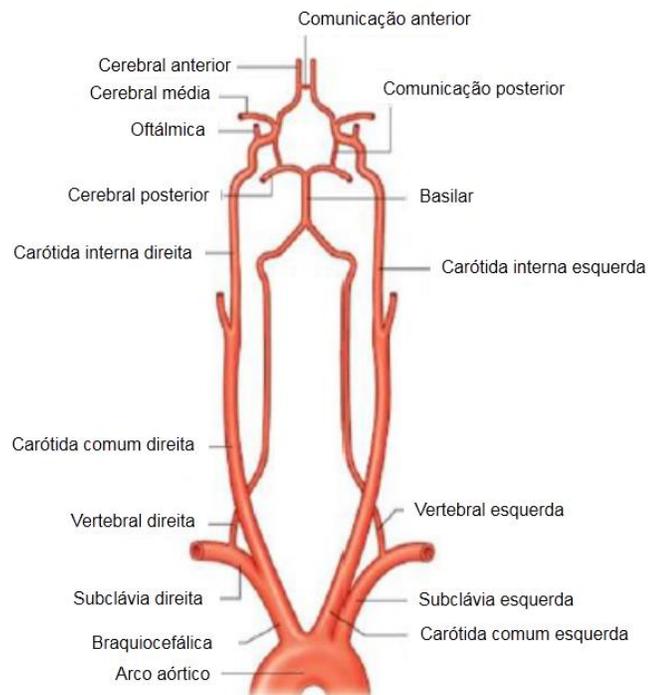
cerebrais direita e média após iniciar o uso em crianças com velocidades elevadas de DTC na dose máxima tolerada de HU (ZIMMERMAN et al., 2007).

## 2.6. DOPPLER TRANSCRANIANO (DTC)

O DTC por insonação é um método não invasivo que mede as velocidades do fluxo sanguíneo cerebral nas artérias cerebrais basais, especialmente as artérias carótidas internas terminais, média e anterior. Para entender completamente o papel do procedimento na medição de velocidades de fluxo sanguíneo cerebral, será necessário fazermos uma breve descrição do suprimento de sangue para o cérebro.

## 2.7. SUPRIMENTO SANGUÍNEO CEREBRAL

Dois pares de artérias, a carótida interna direita e esquerda e as artérias vertebrais direita e esquerda fornecem sangue ao cérebro. As quatro artérias entram na base do crânio, atravessam a duramáter e formam a rede de vasos na base do cérebro, chamada de círculo de Willis. O primeiro grande conjunto de fornecimento de sangue arterial cerebral decorrente desta rede inclui as artérias cerebral média e anterior da artéria carótida interna e as artérias cerebrais posteriores da artéria basilar, formadas a partir das duas artérias vertebrais (Fig 3). A artéria cerebral média é o maior ramo da artéria carótida interna e fornece a superfície lateral dos lobos temporal e parietal e parte do lobo frontal. É a artéria mais frequentemente ocluída no AVC, o que leva a interrupção do suprimento de sangue para as áreas motoras primárias e sensoriais da face, garganta, mão e braço, bem como o hemisfério dominante. A artéria cerebral anterior nutre o lobo frontal, a parte do cérebro que controla pensamentos lógicos, personalidade e movimentos voluntários, especialmente do membro inferior. A artéria cerebral posterior, o ramo terminal da artéria basilar, fornece os lobos temporal e occipital dos hemisférios direito e esquerdo.



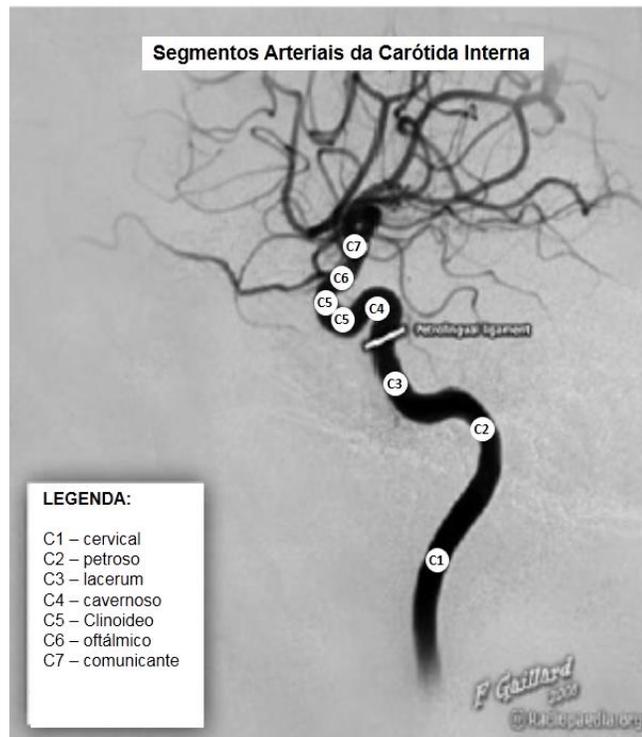
**Figura 3.** Circulação arterial cerebral, aspectos anatômicos (Adaptado de SCHUENKE et al., 2016).

A circulação da carótida e vertebral está ligada na base do cérebro pelas artérias comunicantes posteriores, enquanto as artérias cerebrais anteriores direita e esquerda estão ligadas pelas artérias comunicantes anteriores, conectando assim em ambos os hemisférios cerebrais. A artéria oftálmica, o primeiro ramo intracraniano da artéria carótida interna, forma anastomose com a artéria carótida externa ao redor da órbita. Estas ligações arteriais ou colaterais tornam-se mais funcionalmente importantes quando há oclusão ou estenose das grandes artérias cerebrais, quando os colaterais se abrem para fornecer sangue às partes ocluídas do cérebro. Com estenose progressiva das artérias carótidas internas intracranianas e seus ramos proximais, pode desenvolver-se uma doença similar a Moyamoya (pseudo moyamoya) que predispõe os pacientes afetados ao AVC (SCOTT et al., 2009). Moyamoya, (sopro de fumaça nebulosa" em japonês), é uma doença cerebrovascular crônica oclusiva envolvendo estenose bilateral ou oclusão da porção terminal das artérias carótidas internas (ACIs) e / ou das porções proximais das artérias cerebrais anteriores e das artérias cerebrais médias (ACMs) de causa desconhecida (BURKE et al., 2009).

O volume de fluxo sanguíneo está relacionado com a velocidade e a área da secção transversal do vaso sanguíneo, tal como ilustrado na fórmula “ $F = VA$ , onde  $F$  = volume do fluxo sanguíneo,  $V$  = velocidade do fluxo sanguíneo,  $A$  = área da secção transversal dos vasos

sanguíneos”. Significa, portanto, que se o volume do fluxo sanguíneo permanecer constante na artéria estenótica ou constritiva (como na vasculopatia falciforme ou vasoespasma), a velocidade deve aumentar. Ou seja, como explicado pelo efeito de Bernoulli, o aumento na velocidade em vaso estenosado é inversamente proporcional à redução na área do lúmen do vaso sanguíneo (KLABUNDE, 2012). Se a diminuição de área atinge o ponto crítico, prejudicará o volume de suprimento de sangue cerebral e aumentará a chance de desenvolvimento de AVC isquêmico. É também digno de nota que alguns fatores fisiológicos afetam a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, incluindo a idade (diminui com o aumento da idade), hematócrito (aumenta com a redução do Hct), dióxido de carbono (para cada 1mm de aumento de CO<sub>2</sub>, ocorre o aumento do fluxo sanguíneo cerebral), febre (para cada aumento de 1° C na temperatura, aumento de 10% no fluxo sanguíneo cerebral) e pressão arterial (BODE, 1988; PETERSON et al., 2011).

A artéria carótida interna distal e seus ramos principais estão predispostos à vasculopatia da DF, devido ao seu curso único (Fig 4). A parte supraclínóide com sua tortuosidade inerente, que forma uma divisão terminal em artérias cerebrais média e anterior, é a mais vulnerável devido à sua falta de suporte ósseo e exposição a fatores hemodinâmicos adversos e fluxo turbulento, com consequente predisposição ao dano endotelial e à proliferação intimal. A alteração do fluxo sanguíneo na artéria carótida interna supraclínóide e sua divisão nas artérias cerebrais anterior e média poderia permitir interações entre os eritrócitos e as células endoteliais promovendo a remodelação vascular e a vasculopatia vascular, achado característico em pacientes com AF com AVC (ABBOUND et al., 2004). A vasculopatia resulta no estreitamento do lúmen arterial e, consequentemente, no aumento da velocidade do fluxo sanguíneo.

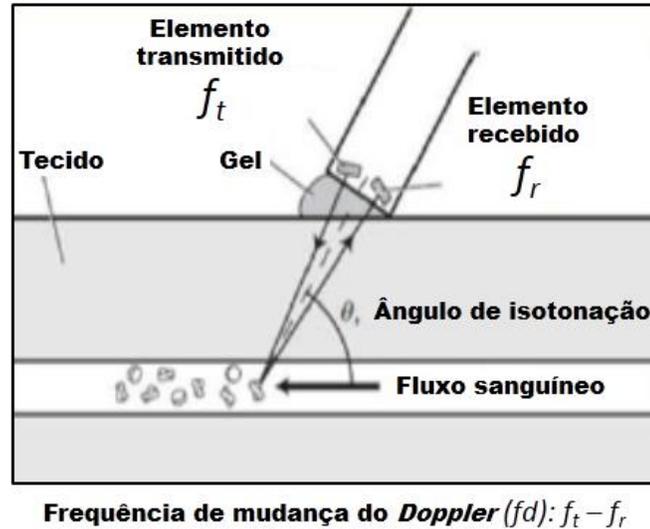


**Figura 4.** Angiografia mostrando o curso da artéria carótida interna intracraniana (Adaptado de FRANK GAILLARD, 2008).

## 2.8. PRINCÍPIOS DO DOPPLER TRANSCRANIANO

O DTC utiliza sonda transdutora de baixa frequência ( $\leq 2$  MHz) para insonar as artérias cerebrais basais em regiões do crânio com osso relativamente fino (janelas acústicas) e pode ser usado para monitorar a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e a pulsatilidade do vaso durante um período de tempo com alta resolução temporal. O princípio físico é o do efeito Doppler que afirma que quando uma onda sonora atinge um objeto em movimento (insonação), como um eritrócito, a onda refletida sofre uma mudança de frequência diretamente proporcional à velocidade do refletor ( $v$ ). O DTC usa o Doppler de onda pulsada para vasos em diferentes profundidades do cérebro. A onda refletida a partir dos eritrócitos em movimento é recebida pelo transdutor e transformada de volta ao sinal elétrico. Este é subtraído da onda transmitida, amplificado e processado por análise espectral e audível, a partir do qual o efeito Doppler ( $fd$ ) e velocidade do fluxo sanguíneo ( $v$ ) são calculados. A análise audível permite ao examinador ouvir o fluxo sanguíneo em um vaso enquanto a análise espectral mostra a exibição visual do sinal recebido. A velocidade de fluxo sanguíneo cerebral (VFSC) é calculada a partir da seguinte equação Doppler:  $fd = 2fo \times v \times \cos \theta / c$ ; onde  $c$  é a velocidade da onda som em tecido,  $fo$  é a frequência de pulso

incidente,  $f_d$  é a mudança de frequência,  $\theta$  = ângulo do refletor em relação à sonda de ultra-som,  $v$  = velocidade de refletor (eritrócto). Uma onda espectral é produzida com a velocidade sistólica máxima, a velocidade diastólica final e os valores médios de velocidade como mostrado na figura 5 (BODE, 1988; McCARTNEY et al., 1997).



**Figura 5.** Os princípios técnicos do Doppler transcraniano (Adaptado de Thrush, 2005).

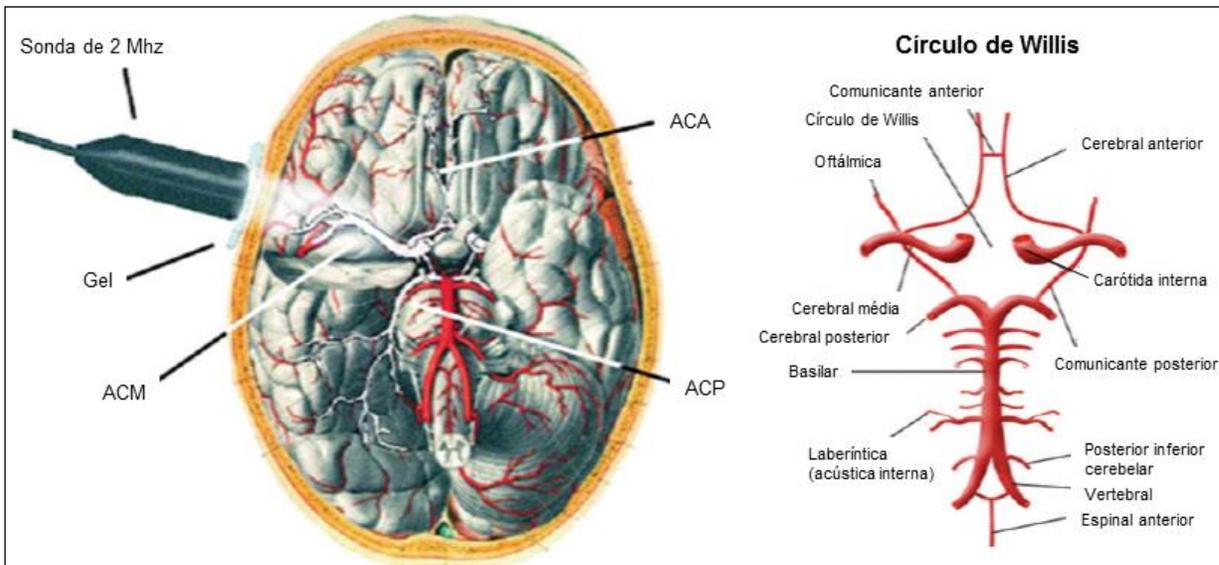
## 2.9. INDICAÇÕES DE DTC

O DTC é indicado, mas não limitado às seguintes situações (ALEXANDROV et al., 2012): avaliação do fluxo sanguíneo cerebral em pacientes com DF para orientar a terapia de transfusão crônica; diagnóstico e monitorização da vasculopatia, tal como a doença similar de Moyamoya; isquemia cerebral aguda com AVC isquêmico ou ataque isquêmico transitório; diagnóstico e monitorização de perturbações cerebrovasculares agudas em pacientes de cuidados intensivos, especialmente em doentes com traumatismo craniano; deteção de êmbolos; confirmação de um diagnóstico clínico de morte encefálica por documentação de parada circulatória cerebral; diagnóstico e monitoramento do vasoespasmó em pacientes com hemorragia subaracnoide.

## 2.10. TÉCNICAS DE DTC

O DTC utiliza transdutor de baixa frequência que emite ondas de ultrassom de forma pulsátil. O acesso aos vasos intracranianos é possível através de áreas em que o osso da calota craniana é fino ou através dos forames naturais (janelas acústicas). Existem quatro janelas

acústicas, nomeadamente: janelas transtemporais, suboccipitais ou foraminais, transorbital e submandibular. A janela acústica mais comumente utilizada é a transtemporal, que está localizada acima do arco zigomático entre o canto lateral do olho e o pavilhão auricular (Figura 6). As artérias cerebral média (ACM), cerebral anterior (ACA), cerebral posterior (ACP) e carótida interna terminal (ACI) podem ser acessadas através desta janela, embora em cerca de 8% a 20% dos pacientes a janela transtemporal possa ser inadequada. Morinoni e cols. documentaram 8,2% de prevalência de janela acústica temporal inadequada, embora a maioria dos pacientes fosse idosa e pudesse ter as janelas acústicas fechadas (MARINONI et al., 1997).



**Figura 6.** Transmissão de ondas pulsáteis de ultrassom através do crânio usando a sonda setorial Doppler pulsada com frequência de emissão de 2,0 MHz. A sonda está posicionada na janela temporal. Painel direito = Círculo de Willis (Adaptado de D'ADREA et al., 2016).

## 2.11. TIPOS DE DTC

Existem dois tipos de DTC, o DTC convencional ou padrão e o DTC duplex codificado por cor (DTC de imagem). Enquanto o último permite a visualização direta da cor dos vasos sanguíneos intracranianos e direção do fluxo sanguíneo, não há diferença nos resultados obtidos entre os dois. Swiat e cols. observaram que a acurácia da detecção do vasoespasma da artéria cerebral média foi semelhante entre a DTC convencional e a ecografia dúplex codificada por cor em pacientes adultos (SWIAT et al., 2009). Krejza e cols. também observaram que a taxa de sucesso de insonação dos vasos intracranianos através da janela temporal foi a mesma para DTC

convencional e de imagem (KREJZA et al., 2007). A diretriz brasileira para DTC em crianças e adolescentes com DF recomenda a DTC convencional (LOBO et al., 2011).

## 2.12. VANTAGENS E DESVANTAGENS DO DTC

O DTC convencional é relativamente barato, reproduzível e pode ser usado para a monitoração da velocidade cerebral do fluxo de sangue a beira de leito em unidades de terapia intensiva. Contudo, apesar destas vantagens, é dependente do operador e pode haver variações entre observadores.

## 2.13. RECOMENDAÇÕES DO DTC NA DOENÇA FALCIFORME

O estudo STOP demonstrou a utilidade da ultra-sonografia Doppler transcraniana na avaliação das velocidades do fluxo sanguíneo cerebral e da prevenção do AVC em crianças com AF. O estudo STOP identifica que crianças com velocidades  $> 200$  cm / s tiveram 10% de chance de AVC por ano (ADAMS et al., 2000). O grupo definiu velocidade de fluxo sanguíneo normal de 70 a  $<170$  cm/s (99% de sobrevida livre de acidentes vasculares), 170-199cm/s como condicional (97% de sobrevida livre de acidente vascular cerebral) e  $\geq 200$ cm/s como velocidades anormais, com sobrevida livre de acidente de 83%.

Com base no resultado do estudo STOP, o Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue (NHLBI) dos EUA recomendou que todas as crianças com DF com idades compreendidas entre os 2 e os 16 anos sejam submetidas ao DTC para identificar àquelas em risco de AVC ([www.nlm.nih.gov/databases/alert/sickle97/html](http://www.nlm.nih.gov/databases/alert/sickle97/html)). Do mesmo modo, as Diretrizes Brasileiras para o DTC em crianças e adolescentes com DF recomendam também que o DTC seja usado na prevenção primária de AVC em todas as crianças dos 2 aos 16 anos com a doença, mas com prioridade para aqueles com AF e HbS $\beta^0$ -tal (LOBO et al., 2011).

O DTC, embora seja confiável na identificação das pessoas com risco de AVC, não está amplamente disponível, especialmente, em países de baixa renda; portanto, crianças com doença não são rotineiramente rastreadas para risco de AVC. O AVC pode ser prevenido se essas crianças forem identificadas pelo DTC e a transfusão profilática de sangue iniciada precocemente. O estudo STOP observou que a transfusão de sangue crônica reduziu o risco de AVC primário em até 92% em crianças com DF (ADAMS et al., 2000).

## 2.14. RELAÇÃO ENTRE OS FATORES DE RISCOS CLÍNICOS DE AVC E VALORES DE DTC NA DOENÇA FALCIFORME

Há pouca informação sobre a relação entre os fatores de risco clínicos de AVC em pacientes com DF, conforme documentado por Ohene-Frenpong (OHENE-FREMPONG et al., 1998) e a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral determinada pelo DTC, embora Hokazono e cols. tenham documentado a correlação negativa entre a velocidade média máxima e o hematócrito (HOKAZONO et al., 2011).

No Brasil, Leite e cols. observaram a correlação positiva entre os resultados condicionais ou anormalmente elevados de DTC e a presença de complicações de DF, como STA, hipertrofia adenotonsilar, apnéia do sono e hipertensão arterial sistólica. Além disso, aqueles com resultados laboratoriais anormais, como hemoglobina baixa, leucocitose e trombocitose, apresentaram maior probabilidade de apresentar resultados de DTC condicional ou anormal (LEITE et al., 2012). A diminuição da saturação de oxigênio da hemoglobina ( $SPO_2$ ) está associada ao aumento da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral. No estudo para determinar a correlação entre a velocidade de DTC e a saturação de oxigênio, Quinn e cols demonstraram a correlação inversa entre os valores de DTC e  $SPO_2$  nas artérias cerebrais direita e média entre crianças com DF (QUINN et al., 2009).

As crianças com AF são cronicamente anêmicas com capacidade reduzida de transporte de oxigênio. Isto resulta em fornecimento reduzido de oxigênio aos tecidos com aumento subsequente da frequência cardíaca, débito cardíaco e volume de fluxo sanguíneo (METIVIER et al., 2000). Uma vez que o volume de fluxo sanguíneo está diretamente relacionado com a velocidade do fluxo sanguíneo, estas crianças estão, portanto, com risco alto de desenvolvimento de AVC.

### **3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Além de realizar DTC para detetar a velocidade elevada do fluxo sanguíneo cerebral, existem outros parâmetros que podem indicar o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral em crianças com doença falciforme? A nossa hipótese é a de que a idade, a concentração de hemoglobina, saturação de oxigênio e contagem de leucócitos e plaquetas influenciam a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral em crianças e adolescentes com DF. Desta forma, o presente estudo avaliou, durante um ano, as velocidades de fluxo sanguíneo cerebral de crianças e adolescentes com DF realizando a identificação daqueles com risco alto para desenvolver AVC, através da análise da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral entre diferentes faixas etárias, sexo, genótipo e uso ou não de HU. O nosso estudo explorou a relação entre a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral e os perfis clínico, hematológico e a saturação de oxigênio da hemoglobina em crianças e adolescentes com DF em Salvador-Bahia.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Quantificar as velocidades de fluxo sanguíneo cerebral de crianças e adolescentes com doença falciforme e sua associação com os perfis hematológico e clínico visando estabelecer marcadores de risco para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de velocidade normal, condicional e anormal do fluxo sanguíneo cerebral e entre os dois hemisférios cerebrais em crianças e adolescentes com doença falciforme;
- Avaliar a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral e sua associação com os parâmetros antropométricos (peso, altura, índice de massa corporal, sexo e idade) e hematológicos dos pacientes com DF;
- Avaliar a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral entre os diferentes genótipos de DF (HbSS, HbSC, HbS $\beta$ -tal).
- Avaliar a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral entre os pacientes em tratamento com a hidroxiureia;
- Avaliar a associação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e a história de síndrome torácica aguda, episódios dolorosos e priapismo;
- Avaliar as velocidades do fluxo sanguíneo cerebral e a saturação arterial de oxigênio periférica (SpO<sub>2</sub>).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo observacional, transversal, realizado durante o período de 12 meses (março de 2016 a fevereiro de 2017).

➤ Critérios de inclusão: os pacientes com DF incluídos no estudo possuíam idade entre dois e 16 anos, tiveram o diagnóstico confirmado (HbSS, HbSC, HbS $\beta$ -tal) e encontravam-se em estado estável. Isto é, os pacientes com DF não apresentavam qualquer doença aguda, não necessitaram de sala de emergência ou internação hospitalar durante as quatro semanas anteriores, e sem história de intercorrência ou doença como inflamação ou infecção nas últimas quatro semanas (BALLAS et al., 2012).

➤ Critérios de exclusão: os pacientes excluídos do estudo foram aqueles cujos responsáveis não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e ou recusaram-se a participar do estudo. Também foram excluídos pacientes com antecedentes de AVC; pacientes em uso de transfusão crônica ou profilática de hemoderivados ou que foram transfundidos por outros motivos nos últimos três meses (BALLAS et al., 2012) ou indivíduos HbAS.

➤ O termo de consentimento e o termo de assentimento da criança, quando possível, foi obtido por escrito enquanto que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Salvador, Bahia (parecer número 314.636).

### 5.2. LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no setor de Hematologia Pediátrica, do Serviço de Pediatria, do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

### 5.3. TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho mínimo estimado da amostra foi de 59 pacientes, sendo que o cálculo teve com base a seguinte fórmula:

$N = (Z^2 * p (1-p)) / d^2$ , onde N = tamanho de amostra necessário, Z = nível de confiança (95% ou 1,96), p = proporção de casos na população, d = margem de erro, escolhido como 5% ou 0,05. Em estudo anterior (RODRIGUES et al., 2016) foi demonstrada a proporção de 0,04 para pacientes com DF com DTC anormal.

#### 5.4. RECRUTAMENTO DE PACIENTES

Os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão foram recrutados consecutivamente à medida que se apresentavam à clínica para a ecografia do DTC.

#### 5.5. MÉTODOS

Os fatores dos riscos clínico de AVC: antecedentes de AVC, STA ou pneumonia, episódios algícos recorrente e priapismo foram obtidos dos prontuários médicos dos pacientes. Os parâmetros hematológicos no estado estável e o uso de HU também foram obtidos a partir dos prontuários médicos de cada paciente. Os parâmetros hematológicos de estado estável foram tomados como medidas estimadas nos últimos 3 meses antes de realizar o DTC sem transfusão; e incluíram a concentração de hemoglobina, hematócrito, contagens de reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas e concentração de HbF.

A saturação arterial de oxigênio foi determinada com o oxímetro de pulso (Geratherm Medical, Alemanha) colocado no dedo indicador direito do paciente, enquanto o peso (kg) e a altura (M) foram medidos com o estadiômetro (Balança Pediátrica Mecânica, WELMY INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA) imediatamente após a realização do DTC. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado a partir da fórmula:  $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (M}^2\text{)}$ .

O rastreamento pelo DTC convencional foi realizado utilizando transdutor de sonda Doppler (2MHZ) de dispositivo único (Sonatek, Viasys Healthcare and Cardinal Health, EUA) nas janelas transtemporais. O DTC foi realizado conforme recomendado nas Diretrizes Brasileiras para DTC em crianças e adolescentes com DF. As indicações, procedimentos e riscos do exame foram explicados aos pacientes e / ou responsáveis antes da sua execução.

O exame foi feito enquanto o paciente estava em posição supina, acordado, calmo e alerta, mas não se permitiu dormir porque o aumento de CO<sub>2</sub> durante o sono pode aumentar o fluxo sanguíneo cerebral bem como a velocidade. A janela trans-temporal foi localizada logo acima do arco zigomático entre o canto lateral do olho e a orelha. A sonda de DTC de frequência 2MHz

lubrificada foi colocada sobre a janela acústica para insonar os vasos. As artérias cerebrais basais foram identificadas com base na direção relativa da sonda dentro de uma janela acústica específica, direção do fluxo sanguíneo em relação à sonda e profundidade de insonação. A distância do transdutor para o ponto em que o fluxo está sendo amostrado é chamada de "profundidade" e geralmente é exibida na tela da máquina do DTC. A artéria carótida interna distal (ACI) foi identificada deslocando o volume da amostra medialmente e inclinando ligeiramente o transdutor caudalmente e encaminhando até que fossem obtidos sinais Doppler que indicassem fluxo em direção à sonda. Para artéria cerebral média (ACM), o transdutor foi direcionado horizontalmente e a artéria identificada a profundidades de 35 a 55mm com fluxo sanguíneo para a sonda, enquanto a artéria cerebral anterior (ACA) foi observada a profundidades de 60 a 70mm com fluxo sanguíneo afastado da sonda quando o feixe de ultra-som foi direcionado horizontalmente ou em uma ligeira direção craneal-dorsal (BODE, 1988).

Ambos os sinais audíveis e visuais da forma de onda Doppler foram avaliados para reconhecer a turbulência e outras pistas sonoras que sugerem altas velocidades; e com o objetivo de obter o sinal mais limpo, mais nítido e de alta velocidade. As velocidades médias máximas (VMMAx) na ACI, as artérias proximais ACM e ACA foram registradas de ambos os hemisférios de acordo com o protocolo STOP para a DF (NICHOLAS et al., 2001). A VMMAx foi medida em ambas direita e esquerda de janela transtemporal, e o valor da mais elevada considerada como a VMMAx do paciente. A classificação STOP do resultado de DTC é mostrada na tabela 1. O seguidor de forma de onda ou um envelope branco controla a velocidade mais alta exibida (VMMAx) acima da linha zero. O computador calculou o VMMAx a partir das velocidades registradas pelo seguidor de forma de onda que rastreia as velocidades mais elevadas ao longo do tempo.

**Tabela 1.** Classificação dos resultados de DTC, tendo como base os resultados do estudo Stroke Prevention in Sickle Cell Disease (STOP).

Normal	VMMAx < 170 cm/s
Condicional	VMMAx >170 e <200 cm/s na artéria cerebral média e/ou artéria carótida interna distal
Anormal	VMMAx >170 na artéria cerebral posterior ou anterior VMMAx ≥200 cm/s na artéria cerebral media e/ou artéria carótida interna terminal
Inadequada <sup>a</sup>	

VMMAx = velocidade media máxima; <sup>a</sup> exame incapaz de ser lido.  
(Adaptado de Nicolas et al., 2001)

Os resultados anormais do DTC foram repetidos após duas semanas para confirmação. Outros foram realizados de acordo com a Diretrizes Brasileiras para o DTC em crianças e adolescentes com DF.

## 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o software estatístico (STATA 10, College Station, Tex.:StataCorp) e (SPSS 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). As variáveis de intervalo foram apresentadas como médias e desvios-padrão para variáveis paramétricas ou mediana e intervalo para variáveis não-paramétricas. As variáveis categóricas foram apresentadas em forma de proporções e percentuais. O teste de significância foi obtido pelo teste T para variáveis de intervalo paramétrico e o teste de Mann Whitney para variáveis não-paramétricas. O teste qui-quadrado e o teste exato de Fischer foram utilizados para testar a significância das variáveis categóricas. As correlações foram calculadas usando os coeficientes de correlação de Spearman. A análise de regressão linear foi utilizada para estabelecer associações entre variáveis dependentes e independentes. O risco relativo de ter o resultado anormal ou condicional de DTC foi calculado para aqueles que tinham história de fatores de risco clínico em estudo. O teste de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Foram realizados 148 exames de DTC. No entanto, foram realizadas sete triagens em pacientes com DF que haviam sido submetidos a transfusão profilática de sangue ou foram transfundidos nos últimos três meses e, portanto, foram excluídos. Os restantes 141 exames foram realizados em 135 indivíduos que preencheram os critérios de inclusão. O último resultado do DTC foi considerado para aqueles pacientes que tiveram o DTC repetido. Dos 135 pacientes, cujos dados foram analisados, 74 (54,8%) eram do sexo feminino e 61 (45,2%) do masculino. A distribuição etária dos pacientes não foi normal (teste de Shapiro-Wilk W:  $p = 0,004$ ), a mediana de idade foi de 8 anos (2-16). Noventa e três (68,9%) pacientes apresentaram genótipo HbSS, 41 (30,4%) HbSC e um (0,7%) apresentou talassemia  $S\beta^+$ . Cinquenta e um (37,8%) pacientes estavam em uso de HU no período de rastreamento de DTC, sendo esta por várias indicações como crises álgicas recorrentes, história progressiva de STA ou velocidade elevada ao DTC. A mediana de peso dos pacientes foi de 23,6 (11-75,2) kg. A Tabela 2 mostra as características demográficas dos pacientes e a tabela 3 os dados de antropometria.

### 6.2. TRIAGEM PELO DOPPLER TRANSCRANIANO

A distribuição dos dados de velocidade de DTC também foi encontrada como não paramétrica como indicado pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk W ( $p = 0,001$ ). A mediana geral da VMMA foi de 125cm/s (74,4-202). O resultado do DTC foi categorizado em baixo ( $<70$ cm/s), normal (70-  $<170$ cm/s), condicional (170-199cm/s) ou anormal ( $\geq 200$ cm/s) de acordo com a classificação STOP. O resultado indicou que 116 (85,93%) pacientes apresentaram resultado normal, 18 (13,33%) condicional e um (0,74%) paciente apresentou resultado anormal de DTC ( $\geq 200$ cm/s) (Figura 7).

### 6.3. COMPARAÇÃO DA VELOCIDADE DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL ENTRE OS SEXOS

A análise do grupo de gênero mostrou que a mediana de VMMA para o sexo feminino foi 125,5 cm / s (74,7-199) enquanto que para o masculino foi de 122cm/s (74,4-202), indicando

não haver diferença significativa entre os sexos (teste de Mann-Whitney,  $p = 0,5$ ). A figura 8 mostra o boxplot comparando VMMA entre os sexos.

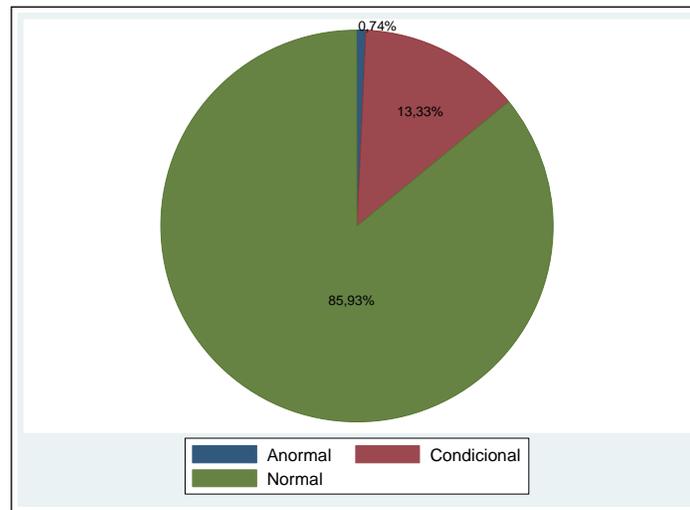
**Tabela 2.** Características dos pacientes com doença falciforme.

Variáveis	N	%	% cumulativa
<b>Sexo</b>			
Masculino	61	45,2	45,2
Feminino	74	54,8	100,0
Total	135	100,0	
<b>Idade</b>			
2-5	41	30,4	37,4
6-9	43	31,8	62,2
10-13	27	20,0	82,2
14-16	24	17,8	100,0
Total	135	100,0	
<b>Genótipo</b>			
SS	93	68,9	68,9
SC	41	30,4	99,3
Thalassemia $S\beta^+$	1	0,7	100,0
Total	135	100,0	
<b>Uso de hidroxiureia</b>			
Sim	51	37,8	37,8
Não	84	62,2	100,0
Total	135	100,0	

**Tabela 3.** Parâmetros antropométricos dos pacientes com doença falciforme submetidos ao DTC.

Variáveis	N	Mediana	Média	DP	Min.	Max.
Peso (Kg)	135	23,6	27,7	14,1	11	75,2
Altura (M)	135	1,3	1,3	0,2	0,8	1,8
IMC (Kg/M <sup>2</sup> )	135	16,3	16,7	3,1	10,7	27,3

DP= desvio padrão ; DTC= doppler transcraniano ; IMC= indice de massa corporal ; Min= mínimo; Max= máximo



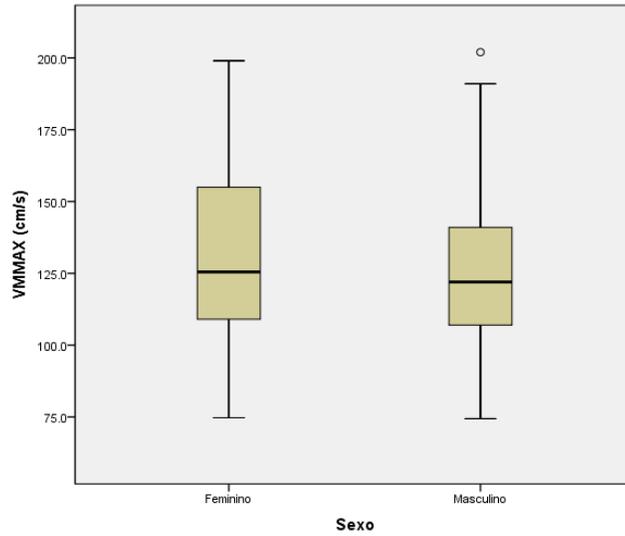
**Figura 7.** Resultados de DTC dos pacientes com doença falciforme investigados.

Ao analisarmos os resultados do DTC e associa-los ao sexo; entre os homens, um (1,6%) paciente apresentou resultado anormal de DTC, 8 (13,1%) apresentaram resultados condicionais, enquanto 52 (85,2%) apresentaram resultado normal; com relação as mulheres, nenhuma apresentou DTC anormal, 10 (13,5%) apresentaram o DTC condicional e 64 (86,5%) apresentaram DTC normais. Também não houve diferença significativa nos resultados do DTC. (Teste exato de Fisher,  $p = 0,7$ ).

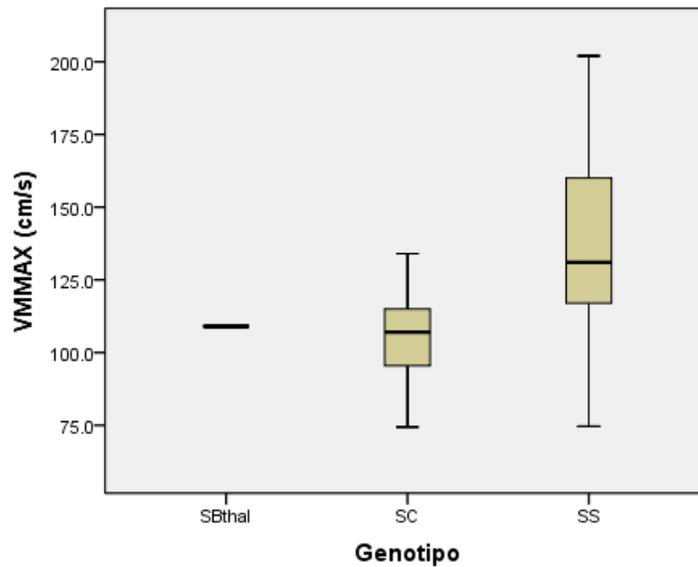
#### 6.4. PACIENTES COM AF APRESENTARAM VELOCIDADES DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL MAIS ELEVADAS EM COMPARAÇÃO AOS OUTROS GENÓTIPOS DE DF ESTUDADOS

Comparando-se as velocidades de fluxo sanguíneo cerebral entre os diferentes genótipos, observou-se que pacientes com AF apresentaram maior VMMAx em comparação com os pacientes com doença HbSC. Para os pacientes com AF, a mediana da VMMAx foi de 131cm/s (74,7-202), enquanto de 107cm/s (74,4-134) para HbSC. O único paciente com talassemia  $S\beta^+$  apresentou VMMAx de 109cm/s. Houve diferença estatisticamente significativa entre as velocidades de fluxo sanguíneo cerebral de pacientes de diferentes genótipos analisados (teste de Kruskal-Wallis,  $p = 0,0001$ ) (Figura 9 e Tabela 4). O resultado da DTC também mostrou que um (1,1%) paciente com anemia falciforme apresentou resultado anormal e 18 (19,4%) apresentaram resultados condicionais. Entre os pacientes com doença HbSC não houve DTC anormal nem condicional, indicando

diferença estatisticamente significativa entre os genótipos (Teste exato de Fischer,  $p = 0,003$ ) (Tabela 5).



**Figura 8.** Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes com base no sexo.



**Figura 9.** Velocidades do fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes de acordo com o genótipo da doença falciforme.

**Tabela 4:** velocidades de fluxo sanguíneo cerebral de crianças e adolescentes com DF em relação aos seus genótipos.

Genótipo	N	Mediana (cm/s)	Média (cm/s)	DP (cm/s)
Sβ-thal	1	109	109	-
SC	41	107	105,3	14,9
SS	93	131	138,5	28,5
P		0,0001		

DP= desvio padrão

**Tabela 5.** Resultados do DTC das crianças com DF de acordo com genótipo.

DTC	HbSS	HbSC	HbSβ-thal	Total (%)
Anormal	1(0,74)	0(0)	0(0)	1(0,7)
Condicional	18(13,33)	0(0)	0(0)	18(13,33)
Normal	74(54,81)	41(30,4)	1(0,7)	116(85,9)
Total	93(68,90)	41(30,4)	1(0,7)	135(100)

DTC: doppler transcraniano.

#### 6.5. PACIENTES EM USO DA HIDROXIUREIA APRESENTARAM VELOCIDADES DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL COMPARÁVEIS COM AQUELES QUE NÃO A ESTAVAM UTILIZANDO

Embora a mediana das VMMAX dos pacientes em uso de HU (128,0 cm/s (74,4-202)) tenha sido relativamente maior que aqueles que não usaram o fármaco (121,0 (74,7-199))cm/s, a diferença não foi estatisticamente diferente (Mann- Whitney:  $p = 0,4$ ). A figura 10 é um boxplot que compara a velocidade do DTC entre os pacientes em uso ou não de HU.

O único paciente com resultado anormal de DTC não estava em uso de HU. Onze dos 18 (61,1%) pacientes com resultado condicional não estavam em uso de HU. Não houve diferença estatisticamente significativa no resultado da DTC entre pacientes em tratamento com HU ou não (Teste exato de Fischer,  $p = 0,052$ ).

#### 6.6. EFEITO DA IDADE SOBRE A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL

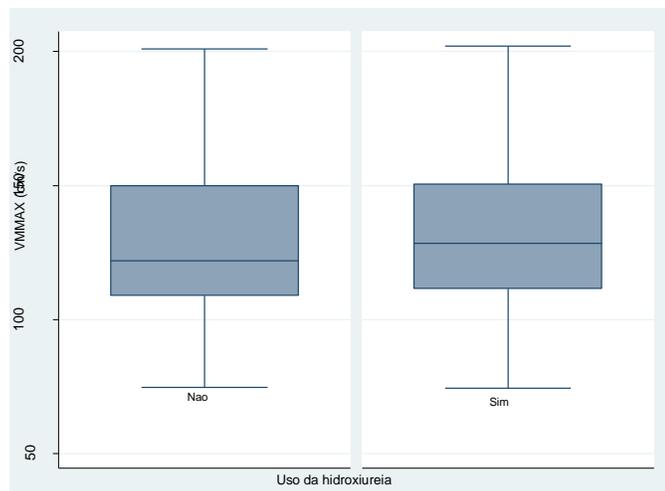
A avaliação do efeito da idade sobre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral de crianças com DF demonstrou que crianças na faixa etária de 6 a 9 anos apresentaram o

aumento da velocidade de fluxo com mediana de VM MAX de 131cm / s e média de 134,7 (28,2) cm / s, enquanto que a faixa etária de 14-16 anos apresentou a menor velocidade com velocidade mediana de 111cm / s e média de 109,4 (29,4) cm / s (Figura 11). Após da faixa etária de 6 a 9 anos, a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral diminuiu com o aumento da idade, conforme demonstrado na tabela 6. A análise do teste de significância mostrou que esta diferença foi estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis:  $p = 0,01$ ). A análise de correlação com o tamanho da amostra de 135 também mostrou correlação negativa estatisticamente significativa entre idade e VFSC dos indivíduos ( $\rho$  de Spearman= -0,2,  $p = 0,02$ ) (Figura 12). O resultado anormal de DTC foi de um paciente na faixa etária 2-5 anos, enquanto a maioria (16/18) dos resultados condicionais foi relatados entre os menores de 10 anos.

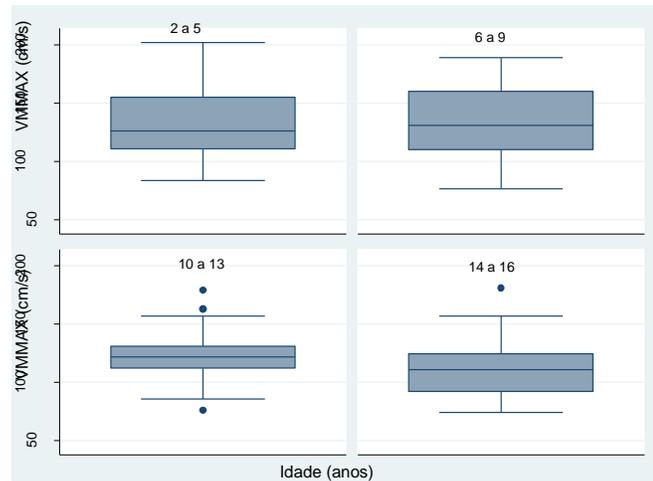
**Tabela 6:** Resultados de DTC de acordo com a idade dos pacientes com doença falciforme.

Idade (anos)	N (%)	Mediana (cm/s)	DTC		
			Normal (%)	Condicional (%)	Anormal (%)
2-5	41 (30,4)	127,0	32 (23,7)	8 (5,9)	1(0,7)
6-9	43 (31,8)	131,0	35 (25,9)	8 (5,9)	0 (0)
10-13	36 (26,7)	121,5	26 (19,3)	1(0,7)	0 (0)
14-16	15 (11,1)	111,0	23 (17,0)	1(0,7)	0 (0)
P		0.01			

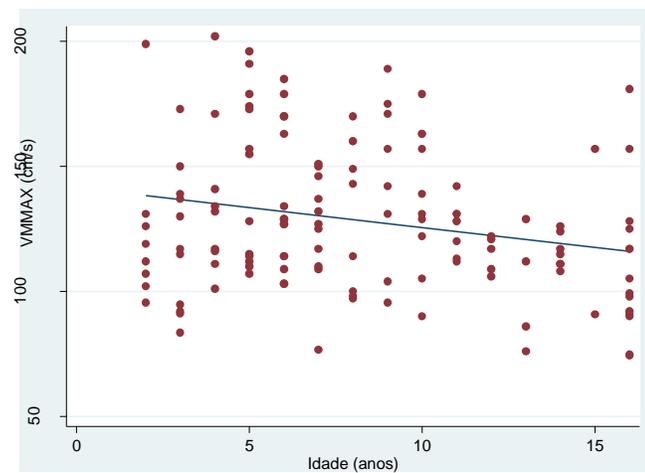
DTC: doppler transcraniano.



**Figura 10.** Velocidade de fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes com doença falciforme de acordo com o uso ou não de hidroxiuréia.



**Figura 11.** Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral com base na idade do paciente.



**Figura 12.** Correlação entre a velocidade de DTC e a idade dos pacientes com doença falciforme.

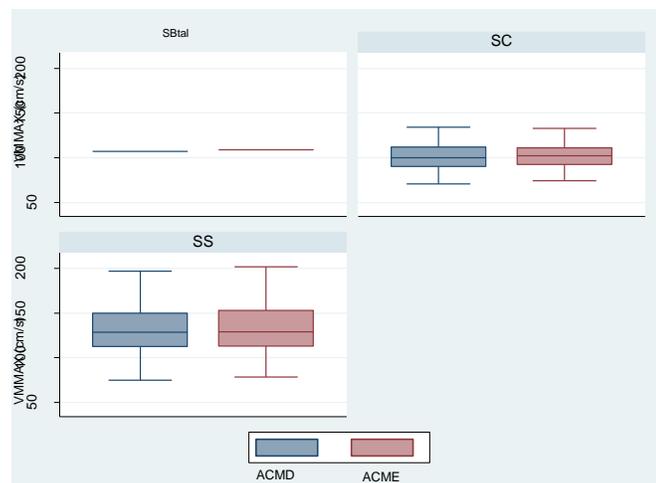
## 6.7. RELAÇÃO ENTRE A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL E A ANTROPÔMETRIA DOS PACIENTES

A análise de correlação de Spearman dos 135 pacientes mostrou correlação negativa entre as velocidades de DTC e o peso, altura e índice de massa corporal dos pacientes. A relação também foi encontrada como estatisticamente significativa para cada um dos parâmetros ( $\rho = -0,31, -0,27, -0,31$  e  $p = 0,0006, 0,002, 0,0002$ , respectivamente). Esta correlação inversa implica que o

aumento do peso, altura ou IMC está associado a diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e vice-versa.

#### 6.8. A VMMAX É COMPARÁVEL NOS HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DIREITO E ESQUERDO

A velocidade de fluxo sanguíneo cerebral no hemisfério direito não diferiu significativamente do esquerdo. Enquanto a mediana de VMMAx na artéria cerebral média direita foi de 118cm/s (70,5-197), a da esquerda foi de 120cm/s (74,4-202). A diferença na velocidade de DTC nos dois hemisférios cerebrais não foi estatisticamente significativa (teste de Wilcoxon signed-rank:  $z = -0,9$ ,  $p = 0,4$ ). Esse padrão de comparação foi mantido nos diferentes genótipos como pode ser observado na Figura 13.



**Figura 13.** Comparação de VMMAx pela direita e esquerda em artérias cerebrais média entre os diferentes genótipos da DF. ACMD= artéria cerebral média direita; ACME= artéria cerebral média esquerda.

#### 6.9. SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA (SPO<sub>2</sub>) COMPARADA ENTRE AS CATEGORIAS DE RESULTADO DO DTC

O estudo comparou a saturação de oxigênio da hemoglobina entre os pacientes em relação aos seus resultados de DTC. Observou-se que pacientes com resultado anormal ou condicional apresentaram saturação de oxigênio baixa (<95%) em comparação com aqueles com resultado normal. O paciente com resultado anormal apresentou SpO<sub>2</sub> de 92%, enquanto aqueles com

resultado condicional ou anormal tiveram SpO<sub>2</sub> mediana de 94% e 97%, respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis:  $p = 0,0002$ ).

Conforme ilustrado na figura 14, a relação entre a saturação periférica de oxigênio da hemoglobina (SpO<sub>2</sub>) e a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral também foi analisada, utilizando a correlação de Spearman. Houve correlação negativa entre a saturação de oxigênio da hemoglobina (SpO<sub>2</sub>) e a VFSC em crianças e adolescentes com DF e a correlação foi estatisticamente significativa ( $\rho = -0,34$ ,  $p = 0,0001$ ). Isto sugere que a diminuição da saturação de oxigênio da hemoglobina está associada ao aumento na velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e vice-versa.

#### 6.10. CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO, CONTAGEM DE RETICULÓCITOS E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM DIFERENTES RESULTADOS DE DTC

As concentrações de hemoglobina dos pacientes foram comparadas de acordo com as categorias de resultado do DTC. A distribuição da hemoglobina foi paramétrica (teste de Shapiro-Wilk,  $p = 0,09$ ). Enquanto que o paciente com resultado anormal de DTC teve a concentração de hemoglobina de 6,9g / dl, a concentração média de hemoglobina para aqueles com velocidades condicionais e normal foi de 7,8 g / dl e 9,2 g / dl, respectivamente. A análise de variância (oneway ANOVA) indicou que a diferença na hemoglobina foi estatisticamente significativa (ANOVA:  $F = 5,58$ ,  $p = 0,005$ ). O hematócrito médio foi de 21%, 23,2% (2,8) e 27,4% (4,4), respectivamente, para as velocidades anormais, condicionais e normais. A diferença no hematócrito entre os pacientes com diferentes categorias de resultado de DTC também foi estatisticamente significativa (ANOVA:  $F = 5,19$ ,  $p = 0,008$ ).

Aqueles pacientes com resultado de DTC condicional tiveram a contagem mediana de reticulócitos mais elevada, de 8,3%, enquanto o paciente com o DTC anormal e aqueles com resultados normais tiveram as contagens de 3,6% e 4,4%, respectivamente. A diferença não foi estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis:  $p = 0,1$ ). Os pacientes com velocidades anormais ou condicionais de DTC apresentaram porcentagem menor de HbF que aqueles com valores normais, conforme demonstrado pela mediana de 9,2% para a HbF, em comparação com 6,3% e 3,2%, respectivamente, em pacientes com velocidades condicionais e anormais. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis:  $p = 0,05$ ). A

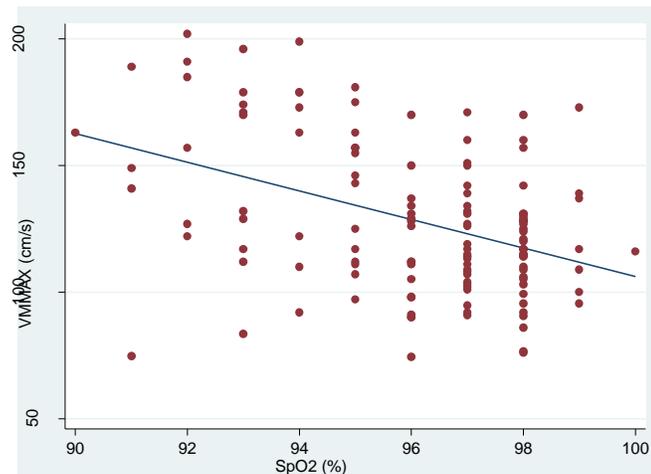
Tabela 7 mostra a SpO<sub>2</sub> e as variáveis hematológicas dos pacientes em relação aos seus resultados de DTC.

**Tabela 7.** Variáveis hematológicas e SpO<sub>2</sub> de acordo com o resultado do DTC dos pacientes com doença falciforme.

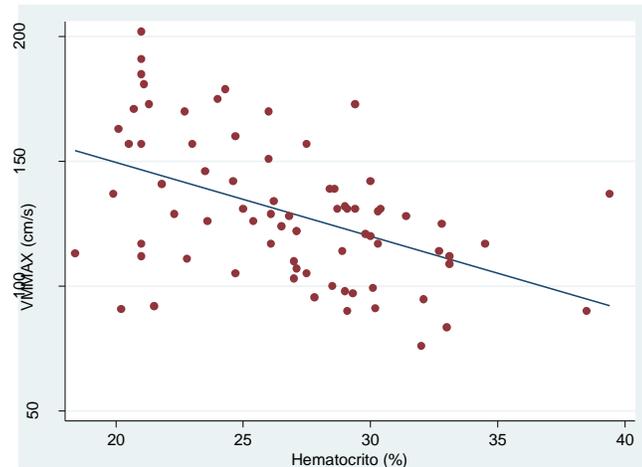
DTC	Hct (%)	Hb (g/dl)	SpO <sub>2</sub> (%)	Leuc (/L)	CAN (/L)	CAM (/L)	Plaquet (/L)	Retics (%)	HbF (%)
Anormal	27,4	9,2	97	9200	5388	727	369148	3,6	9,2
Condicional	23,2	7,8	94	14250	8216	1388	538300	8,3	6,3
Normal	21	6,9	92	12300	6396	1250	529000	4,4	3,2
P	0,008	0,005	0,0002	0,01	0,004	0,0001	0,0003	0,1	0,05

Hct= hematócrito, Hb= Hemoglobina, SpO<sub>2</sub>= saturação de oxigênio, Retics= contagem de reticulócitos, HbF= hemoglobina fetal, Leuc= contagem de leucócitos, CAN= contagem de neutrófilos, CAM= contagem de monócitos, DTC= Doppler transcraniano.

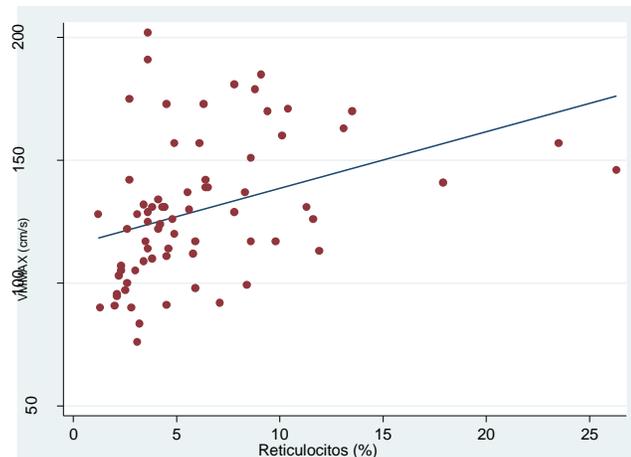
A análise de correlação de Spearman foi também realizada para avaliar a associação entre a VFSC e os índices de hemácias, usando o tamanho da amostra de 75 (número de pacientes que tiveram conjunto de dados completo). Houve correlação negativa entre a VFSC e a concentração de hemoglobina (Hb) e do hematócrito (Hct) ( $\rho = -0,5$ ,  $p = 0,0000$  e  $\rho = -0,5$ ,  $p = 0,0000$ ). Estes resultados sugerem que a redução da Hb ou Hct está associada ao aumento da VFSC. Por outro lado, a correlação entre VFSC e contagem de reticulócitos foi positiva e estatisticamente significativa ( $\rho = 0,5$ ,  $p = 0,0000$ ). Em outras palavras, à medida que a contagem de reticulócitos aumenta, o VFSC também aumenta. Não houve correlação entre a VFSC e a HbF ( $\rho = -0,005$ ,  $p = 0,9$ ). As figuras de 15 e 16 mostram os gráficos de correlação entre a VFSC e Hct e reticulócitos.



**Figura 14.** Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral observada ao DTC e saturação de oxigênio.



**Figura 15.** Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral dos pacientes com doença falciforme e o hematócrito.



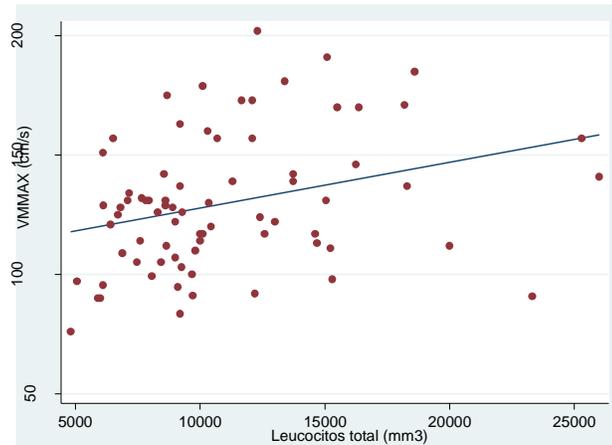
**Figura 16.** Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e a contagem de reticulócitos.

#### 6.11. ASSOCIAÇÃO ENTRE A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL E A CONTAGEM DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS, MONÓCITOS E PLAQUETAS

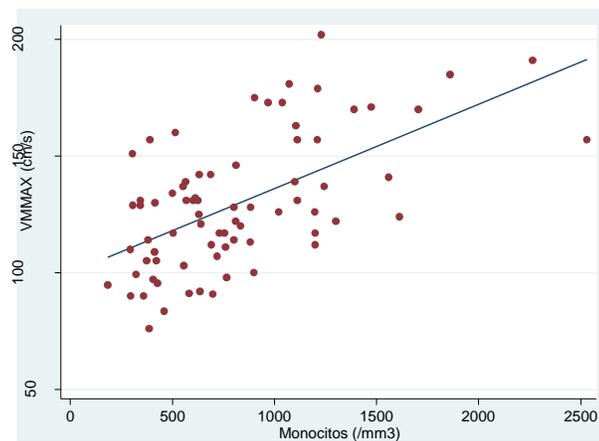
Os pacientes com resultados de DTC condicionais ou anormais apresentaram contagem de leucócitos e plaquetas maiores que aqueles com resultados normais, como mostrado na tabela 7. As diferenças nos leucócitos e contagem de plaquetas foram estatisticamente significativas.

Houve correlação positiva e significativa entre VFSC e contagens totais de leucócitos e plaquetas ( $\rho = 0,34$ ,  $p = 0,003$  e  $\rho = 0,34$ ,  $p = 0,003$ , respectivamente). Na mesma linha, a correlação entre a VFSC e a contagem absoluta de neutrófilos e monócitos foi também positiva e estatisticamente significativa ( $\rho = 0,3$ ,  $p = 0,01$  e  $\rho = 0,53$ ,  $p = 0,0000$ ). Estes resultados sugerem que o aumento dos leucócitos e a

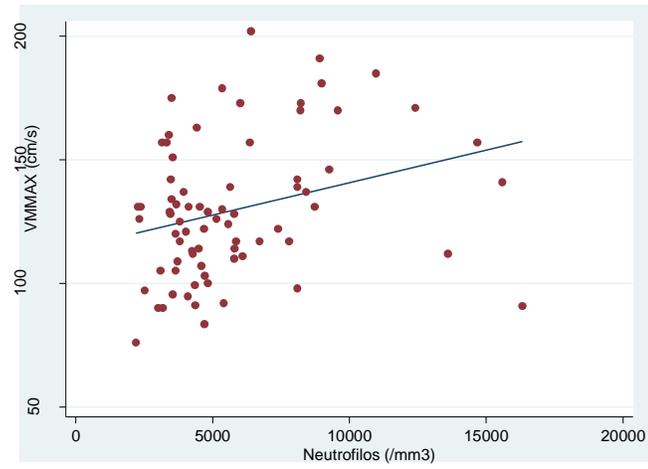
contagem de plaquetas estão associados ao aumento concomitante na VFSC. A tabela 8 mostra a correlação entre a VFSC e os índices hematológicos e saturação de oxigênio, enquanto as figuras de 17-20 mostram a correlação entre VFSC e leucócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas.



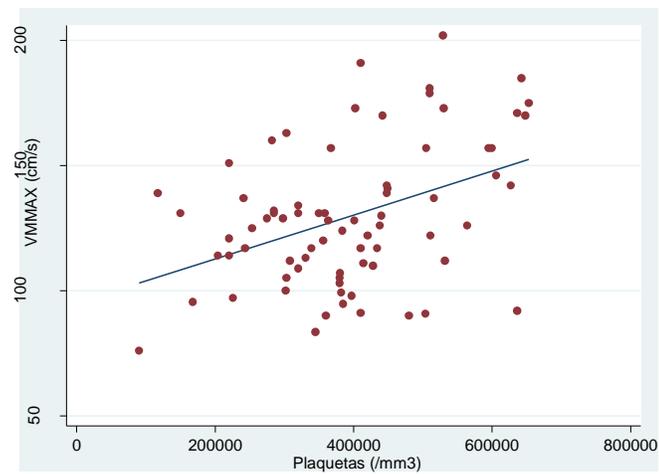
**Figura 17.** Representação gráfica da correlação entre VMMAX e a contagem total de leucócitos.



**Figura 18.** Representação gráfica da correlação entre VMMAX e contagem absoluta de monócitos.



**Figura 19.** Representação gráfica da correlação entre VMMAX e contagem absoluta de neutrófilos.



**Figura 20.** Curva de correlação entre VMMAX e contagem de plaquetas.

**Tabela 8.** Correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e os índices hematológicos e SpO<sub>2</sub> dos pacientes.

DTC	N	Spearman $\rho$	Valor p
SpO <sub>2</sub>	135	-0,35	0,0001
Hemoglobina	75	-0,50	0,0000
Hematócrito	75	-0,50	0,0000
Retics	72	0,51	0,0000
HbF	72	0,03	0,8
Leuco. total	75	0,34	0,003
Plaquetas	75	0,34	0,003
CAN	75	0,30	0,01
CAM	75	0,35	0,0000

Leuco= contagem de leucócitos total; CAM= contagem de neutrófilos; CAM= contagem de monócitos; HbF= hemoglobina fetal; SpO<sub>2</sub> = saturação do oxigênio.

## 6.12. ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

Na análise de regressão linear múltipla, as variáveis de intervalo com distribuição não paramétrica foram transformadas em dados normalmente distribuídos. Contudo, SpO<sub>2</sub>, peso, altura e IMC não puderam ser transformados e permaneceram inalterados. A hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas apresentaram distribuição normal e não foram transformadas.

Após a transformação dos dados, foi realizada análise de regressão múltipla para prever a VFSC como variável dependente e idade, Hb, Hct, HbF, leucócito total, neutrófilo absoluto, monócito, contagem de plaquetas, contagem de reticulócitos e SpO<sub>2</sub> como variáveis independentes.

O modelo de regressão linear múltipla mostrou que as variáveis independentes foram estatisticamente preditoras quanto a variável dependente,  $F(10, 60) = 8,87$ ,  $p = 0,0000$ ), embora responsável por apenas 60% da variabilidade da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral ( $R^2 = 0,5964$ ). A idade do paciente, a contagem total de leucócitos, a contagem absoluta de neutrófilos, a contagem absoluta de monócitos e a concentração de HbF foram estatisticamente preditoras da VFSC de forma independente, quando outras variáveis foram mantidas constantes ( $p = 0,002$ ;  $0,002$ ;  $0,03$ ;  $0,000$  e  $0,007$ , respectivamente) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise de regressão linear múltipla entre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e seus preditores independentes.

VFSC	Coef.	T	Valor p	95% IC
Idade	-0,0006	3,2	0,002	0,0009-0,0002
SpO <sub>2</sub>	-0,0002	0,36	0,7	-0,007-0,01
Hb	-0,004	-1,8	0,08	-0,0005-0,0008
Leuco	1,97	3,17	0,002	3,2-7,3
CAN	1,84	2,23	0,03	1,93-3,48
CAM	9,9	3,95	0,000	0,0002-4,9
Plaquetas	1,03	1,42	0,16	2,48-4,22
Retics	0,00035	1,54	0,13	0,0001-0,0008
HbF	-0,005	-2,79	0,007	0,0009-0,0001

VFSC= velocidade de fluxo sanguíneo cerebral, CAN= contagem de neutrófilos, CAM= contagem de monócitos, Retics= contagem reticulocitos, HbF= hemoglobina fetal.

### 6.13. ASSOCIACAO ENTRE SÍNDROME TORÁCICA AGUDA, EPISÓDIOS ÁLGICOS RECORRENTES E PRIAPISMO COM OS VALORES DE DTC ANORMAL OU CONDICIONAL

Pacientes que tiveram STA/ pneumonia ou episódios álgicos recorrentes que necessitaram de atendimento de emergência ou internação hospitalar tiveram prevalência elevada para o resultado DTC anormal ou condicional. Entre 23 pacientes que apresentaram STA, 12 tiveram DTC alterada enquanto aqueles que apresentaram não, 7 tiveram DTC alterada. A análise de prevalência mostrou que os pacientes que tiveram STA/ pneumonia no ano anterior tiveram seis vezes maior chance de ter resultado DTC anormal ou condicional em comparação com aqueles sem a complicação (razão de prevalência= 6,7;  $X^2 = 33,28$ ,  $p = 0,000$ , IC 95% = 3,44463-12,8711). Ao mesmo tempo, aqueles que tiveram episódios álgicos recorrentes tiveram duas vezes maior chance de ter resultado do DTC anormal ou condicional que aqueles sem a complicação (razão de prevalência= 2,0633,  $X^2 = 13,83$ ,  $p = 0,0002$ , IC 95% = 1,5891- 2,6790). Nenhum caso de priapismo foi registrado no presente estudo. Portanto, não foi possível avaliar o risco imposto por esta complicação no desenvolvimento de velocidade do fluxo sanguíneo alterado.

## 7. DISCUSSÃO

A identificação do risco de ocorrência de AVC em crianças com DF é um progresso na prevenção desse quadro clínico e no manejo dessas crianças em geral. Desde o estudo STOP, que utilizou o DTC, e da instituição do programa profilático de transfusão de hemoderivados, a incidência de AVC nessas crianças diminuiu consideravelmente (ADAMS et al., 1998; ENNINFUL-EGHAN et al., 2010). No presente estudo, a frequência de DTC anormal foi de 0,74% e de condicional foi de 13,33%. A frequência descrita no nosso estudo para o DTC anormal foi comparável as descritas em São Paulo por Hokazono e cols (1,6%) e Melo e cols (0%) em Aracaju (MELO et al., 2006; HOKAZONO et al., 2011), bem como no Rio de Janeiro (LEITE et al., 2012). No entanto foi menor do que a de 8,4% relatada por Lagunju e cols na Nigéria e 13,33% por Hasan e cols no Iraque (LAGUNJU e t al., 2014; HASAN et al., 2016). As diferenças descritas quanto a prevalência de DTC anormal poderiam ter sido relacionadas a irregularidades no acesso à transfusão profilática de sangue para a prevenção primária do AVC na DF ao longo dos anos. O comitê que formulou a Diretriz para DTC em crianças e adolescentes com DF no Brasil recomendou um esquema de transfusão de intervalo de três a seis semanas para pacientes com dois resultados de DTC anormais consecutivos realizados no intervalo de pelo menos duas semanas de prevenção de AVC primário. O acesso à transfusão de sangue não é muito problemático e os pacientes e responsáveis também entendem a importância desta terapia para a prevenção de AVC e outras complicações da doença. É possível que o melhor acesso e aceitação da transfusão de sangue reduzisse o número de pacientes que poderiam ter tido velocidades anormais ou condicionais. Embora o presente estudo não tenha incluído crianças sob regime de transfusão profilática de hemoderivados nem os resultados pré-transfusionais de DTC, existem relatos que comprovam o benefício da transfusão profilática na reversão da velocidade anormal da DTC para a normal (KWIATKOWSKI et al., 2011). A heterogeneidade relacionada ao encontro das velocidades anormais para o DTC na DF descritas nos estudos acima citados, também podem estar associadas a diferenças no número de pacientes rastreados. Os fatores genéticos associados ao aumento do risco de AVC na DF incluem os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta, a co-herança da talassemia alfa, a persistência na produção de HbF, bem como alterações em moléculas de adesão, hiperhomocisteinemia e outros fatores trombofílicos, como a mutação do fator V de Leiden (KORDES et al., 2002; HOPPE et al., 2004).

Há tendência para que a velocidade de DTC condicional se converta em resultado anormal, o que aumenta o risco de AVC (HANKINS et al., 2008), sendo que as consequências podem ser enormes para os pacientes afetados e suas famílias, bem como para o sistema de saúde. Por conseguinte, é imperativo que sejam tomadas medidas para evitar esta conversão. Além da monitoração trimestral ou semestral da velocidade do DTC naqueles pacientes com resultados condicionais, nenhuma medida de intervenção foi ainda recomendada, embora existam evidências que demonstrem a eficácia da HU na prevenção da conversão da velocidade de DTC condicional para normal, reduzindo assim o risco de AVC em crianças com DF (HANKINS et al., 2015). Portanto, é possível que HU tenha impedido a conversão de DTC normal ou condicional em resultado anormal, ou revertido o anormal para resultados condicionais ou normais em nossos pacientes.

Os pacientes com AF apresentaram velocidade maior de DTC em comparação com os outros genótipos de DF. Este resultado está de acordo com o estudo de Hokazono e cols., que relataram velocidades de DTC mais elevadas em pacientes com AF quando comparadas a outros genótipos. (HOKAZONO et al., 2011). Também todos os resultados anormais e condicionais de DTC foram de pacientes com AF no presente estudo. Vieira e cols. observaram também que os pacientes com HbSS apresentaram VFSC significativamente maiores em relação aos pacientes HbSC e sugeriram um ponto de corte mais baixo para estes últimos. O grupo relatou a frequência de DTC anormal em 7,2% dos pacientes com AF em comparação com 0,7% entre os pacientes HbSC (VIEIRA et al., 2016). No entanto, o número de pacientes selecionados por este grupo foi maior que no presente estudo e poderia explicar a frequência mais elevada. A AF é a DF mais grave em comparação com outros genótipos (SARAF et al., 2014). Além da frequência maior de velocidade de DTC anormal ou condicional e do risco maior para ocorrência de AVC, os pacientes com AF apresentam mais hemólise, concentrações menores de Hb, saturações de oxigênio mais baixas e mais complicações cardíacas e diferentes complicações clínicas que pacientes com outros genótipos (NOLAN et al., 2005). Em estudo comparativo referente a doença renal crônica em pacientes com DF, observou-se que a microalbuminúria era mais frequente em pacientes com AF que nos HbSC. Também os pacientes com AF apresentaram taxa menor de filtração glomerular (GFR) que os HbSC (DRAWZ et al., 2016). A AF e a talassemia-S $\beta^0$  geralmente apresentam sintomas clínicos e hematológicos mais graves, enquanto a talassemia-S $\beta^+$  e HbSC apresentam

doença menos grave, com exceção da retinopatia falciforme, que é mais prevalente no último genótipo.

A vasculopatia na DF é exacerbada pela hemólise, interações neutrófilo-célula endotelial e inflamação crônica, que tende a ser mais grave nos indivíduos com AF que nos HbSC. A contagem de hemácias, Hb, Hct, como marcadores de anemia e contagem de reticulócitos, dosagem de desidrogenase láctica sistêmica, aspartato amino transaminase e bilirrubina não conjugada, como marcadores de hemólise; bem como citocinas pró-inflamatórias, leucócitos e contagens de plaquetas estão geralmente elevadas nos indivíduos com AF que nos HbSC (TORRES et al., 2016). O predomínio desses processos patológicos na AF explica porque eles têm sintomas e complicações mais graves e, muito provavelmente, por que todos os resultados anormais e condicionais de DTC foram observados neste grupo de pacientes no presente estudo.

Este estudo também observou que o grupo etário com mediana maior da VFSC foi de 6-9 anos. Posteriormente, a velocidade diminuiu com o aumento da idade. Essa tendência está de acordo com a relatada por Makani e cols. e Lagunju e cols. quando estudaram pacientes com AF com o padrão geral de VFSC em crianças sem a doença (MAKANI et al., 2009; LAGUNJU et al., 2014). De acordo com o estudo de Schöning e cols., a VFSC aumenta acentuadamente a partir dos 3 anos de idade e atinge o pico aos 6 anos de idade, diminuindo gradualmente até 15 anos, quando atinge valor constante (SCHÖNING et al., 1996). Brass e cols. observaram que o fluxo sanguíneo cerebral atinge o máximo aproximadamente no sexto ano de vida, com relação direta entre ele e a velocidade do fluxo sanguíneo (BRASS et al., 1991). Após o período neonatal, o fluxo sanguíneo cerebral e a taxa de metabolismo para oxigênio aumenta com a idade, com pico de sete anos e declinando no adulto e na adolescência, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento e mielinização fisiológica do cérebro (TAKAHASHI et al., 1999).

O presente estudo também estabeleceu a correlação inversamente significativa entre a VFSC e a idade do paciente. Esta tendência, em combinação com outros fatores, tais como fatores genéticos e ambientais, poderia ser a razão pela qual a vasculopatia falciforme, a elevação da VFSC e o AVC são mais comuns em crianças mais jovens com a doença. Portanto, pode ser concebível pensar que a vasculopatia falciforme também está relacionada a infecções nessa faixa etária. Estudos futuros são necessários para comprovar ou não esta hipótese.

Nós descrevemos a correlação negativa entre a VFSC e o peso, altura e IMC dos pacientes, bem como com a idade do paciente, que também relacionou inversamente com VFSC. A

associação entre VFSC e IMC é rara em crianças, embora Selim e cols. retaram a correlação negativa em adultos (SELIM et al., 2008).

Foi observada a correlação negativa significativa entre a VFSC e a saturação periférica de oxigênio, a concentração de Hb e o Hct. Este achado coincidiu com estudos anteriores (MAKANI et al., 2009; OUIIN et al., 2009; LAGUNJU et al., 2014). A dessaturação do sangue prejudica o fornecimento de oxigênio ao tecido cerebral e predispõe ao AVC. Os indivíduos com AF apresentam anemia crônica decorrente de hemólise crônica e infecções recorrentes. A hemoglobina é a proteína transportadora de oxigênio e a sua concentração baixa está associada com a capacidade diminuída de transporte de oxigênio e, portanto, saturação baixa de oxigênio. Na anemia e dessaturação, o sistema circulatório responde aumentando o débito cardíaco e diminuindo a resistência periférica que aumenta o fluxo sanguíneo cerebral através do aumento da velocidade do fluxo sanguíneo (ALIEFENDIOGLU et al., 2007). O aumento do fluxo sanguíneo desencadeia o fluxo turbulento, especialmente no ponto de vasculopatia estenótica, que causa mais lesão endotelial vascular, inflamação, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso vascular, agravamento da estenose e culminando na isquemia cerebral e aumento de risco do AVC (CHISTIYAKOV et al., 2017).

A manutenção da concentração de Hb estável em torno de 10g / dl por transfusões ou fármacos que aumentam esta concentração e de HbF, como a HU, reduz o risco de velocidade anormal do sangue cerebral e AVC em crianças com DF. O aumento na concentração de Hb melhora o transporte de oxigênio e a sua distribuição para o cérebro, reduzindo assim o risco de AVC. A transfusão crônica aumenta a concentração de Hb, reduz a hipoxia e a porcentagem de hemácias falciformes (<30%) e melhora a saturação de oxigênio no tecido cerebral (WANG et al., 2013).

A correlação positiva entre a VFSC e a contagem total de leucócitos, neutrófilos e monócitos, contagem de plaquetas e reticulócitos pode ser atribuída ao fato de que essas células são participantes ativas no processo inflamatório crônico na DF. Vários estudos têm mostrado contagens elevadas e ativação dessas células em pacientes com DF e, mais ainda, naqueles com complicações da doença, como a vasculopatia (VILLAGRA et al., 2007; AKINBAMI et al., 2012). A contagem de reticulócitos é um marcador indireto de hemólise intravascular, processo patológico importante na DF, na qual a Hb e heme livres são liberados para a circulação, com consequente remoção de óxido nítrico (NO), lesão endotelial, aumento de citocinas pró-

inflamatórias e ativação de moléculas de adesão celular (BALLA et al., 2007; GUARDA et al., 2017). Os leucócitos no modelo de regressão linear múltipla estiveram associados de forma independente ao aumento na VFSC, sendo considerado fator de risco importante para o desenvolvimento de AVC em crianças com DF. Conran e cols. observaram que a gravidade da DF está associada ao aumento da contagem de leucócitos, sendo que a redução da contagem de leucócitos melhora a gravidade da doença (CONRAN et al., 2009).

Nos modelos de regressão linear múltipla, a idade do paciente, a contagem de leucócitos total, neutrófilos, monócitos e a concentração de HbF, mas não de Hct nem a SpO<sub>2</sub> foram preditores independentes da VFSC. Estudos diferentes relataram Hct e a SpO<sub>2</sub> como preditores independentes (OUINN et al., 2009). No modelo multivariado de Makani e cols. (2009), o grupo previu a velocidade de DTC com a idade do paciente, SpO<sub>2</sub> e história de febre e observou que a baixa de SpO<sub>2</sub> ≤ 95% e um histórico de febre esteve associado com a velocidade elevada do fluxo sanguíneo cerebral. No presente estudo, o modelo que incluiu apenas SpO<sub>2</sub> e Hct também esteve significativamente associado com a velocidade elevada do fluxo sanguíneo cerebral (não mostrado), mas não quando eles foram submetidos ao modelo com muitas mais variáveis. Em estudo de Colombatti e cols, foi mostrado que a contagem de leucócitos esteve positivamente correlacionada com a VFSC em pacientes com AF, mas não HbSC (COLOMBATTI et al., 2015). A consequência final da vasculopatia cerebral na DF é a estenose vascular que resulta da remodelação do músculo liso vascular, hiperplasia e hipertrofia (KOSHY et al., 1990). Todos resultam de inflamação crônica que é diretamente ou indiretamente desencadeada pela hemólise, aderência de hemácias falciformes e outras células ao endotélio vascular e ativação de células pró-inflamatórias e elaboração de citocinas pró-inflamatórias. (ZHANG et al., 2016).

As crianças que haviam sofrido STA / pneumonia ou crises recorrentes de dor óssea tiveram maior probabilidade de ter VFSC anormal ou condicional. A STA é uma doença aguda caracterizada por febre, sintomas respiratórios agudos, novos infiltrados pulmonares na radiografia de tórax e hipoxia. Esta complicação pode resultar de infecção pulmonar (pneumonia) ou embolia de gordura de infarto ósseo necrótico, resultando em queda na tensão de oxigênio pulmonar, dessaturação de oxigênio, polimerização de HbS, conseqüente de processos patológicos levando a hemólise e inflamação. A STA é um fator de risco conhecido de AVC e outras encefalopatias em pacientes com AF (OHENE-FRENPPONG et al., 1998; HENDERSON et al., 2003). A hipóxia pulmonar da STA pode causar redução no fornecimento de sangue oxigenado a tecidos cerebrais

com lesão endotelial vascular cerebral resultante, modelagem do músculo liso cerebral, estenose com isquemia cerebral e AVC.

O presente estudo apresentou a limitação de termos identificado somente um paciente com resultado de DTC anormal, o que pode ter sido ocasionado pela utilização da HU em alguns pacientes avaliados. Portanto, apesar de termos encontrado associação estatística significativa entre a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral e os perfis hematológico e clínico dos pacientes estudados, seria importante a continuação do referido estudo, de maneira a ampliar o grupo de pacientes acompanhados pelo DTC, com a realização de um estudo longitudinal visando avaliar aqueles com história prévia de AVC, bem como em uso crônico de transfusão sanguínea, no intuito de validação dos resultados obtidos.

## 8. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do presente estudo, concluímos:

- A frequência de velocidade anormal do DTC foi baixa no grupo de pacientes com DF de Salvador-Bahia analisado;
- Os pacientes com AF geralmente apresentaram velocidades de fluxo sanguíneo cerebral maiores e probabilidade maior para velocidades anormais ou condicionais que aqueles com outros genótipos da DF;
- Velocidades mais elevadas e alteradas foram mais frequentes em pacientes jovens, mas o sexo, uso ou não de HU e lado do hemisfério cerebral não afetou o resultado;
- Os pacientes com resultados anormais ou condicionais de DTC tiveram concentração diminuída de hemoglobina e HbF, contagem maior de leucócitos, plaquetas e reticulócitos que seus pares com resultados normais;
- A velocidade do fluxo sanguíneo cerebral correlacionou-se inversamente com a concentração de hemoglobina, hematócrito, saturação de oxigênio e idade dos pacientes; e positivamente com as contagens de reticulócitos, leucócitos totais, neutrófilos absolutos e monócitos absolutos. No entanto, não se correlacionou com a HbF;
- A idade do paciente, a contagem de leucócitos, neutrófilos e monócitos estiveram associadas, de maneira independente, ao desenvolvimento de velocidades DTC anormais ou condicionais, mas não a SpO<sub>2</sub> e a hemoglobina;
- Os resultados obtidos sugeriram que a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral foi afetada pela interação de vários fatores, já que as variáveis independentes contribuíram com apenas 60% da variabilidade da velocidade nos modelos de regressão linear múltipla;
- A probabilidade de desenvolvimento de resultado anormal ou condicional de DTC nos pacientes com DF esteve associada a história prévia de síndrome torácica aguda ou crises de dor óssea recorrentes.

## 9. RECOMENDAÇÕES

- O uso de Doppler transcraniano (DTC) para detetar crianças com DF com risco alto de desenvolvimento de AVC deve ser estendido a todas as unidades de saúde e cuidado dessas crianças pelo Sistema Único de Saúde (SUS);
- Mais trabalhadores de saúde devem ser treinados para executar e interpretar os resultados de DTC;
- Em hospitais com acesso limitado ao Doppler transcraniano e sem a capacidade de realizar a triagem universal, deve-se priorizar aqueles com idade inferior aos dez anos, que tiveram história passada de síndrome torácica aguda ou episódios dolorosos recorrentes, bem como aqueles com baixa saturação de oxigênio (<95 %), hemoglobina diminuída e contagens elevadas de leucócitos e de plaquetas;
- O acesso à utilização da transfusão profilática de hemoderivados para a prevenção primária e secundária do AVC deve ser estendido a todas as unidades de saúde que cuidam de crianças com AF;
- Os médicos que cuidam de crianças com DF devem melhorar sua atitude em relação à prescrição de HU, uma droga que tem sido comprovada por reduzir a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral e prevenir a conversão do resultado condicional de DTC para normal;
- Os programas de conscientização pública sobre a DF devem ser melhorados entre os jovens, cuidadores dos pacientes e do público em geral;
- Estudos posteriores com número maior de indivíduos com a DF e mais variáveis independentes voltadas para prever o aumento da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral em crianças com DF são recomendados.

## REFERÊNCIAS

- ABBOUND, M.R. et al. Magnetic resonance angiography in children with sickle cell disease and abnormal transcranial Doppler ultrasonography findings enrolled in STOP. **Blood**, v. 103, p. 2822-2826, 2004.
- ADAMS, R.J. et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. **Ann. Neurol.**, v. 42, p. 699 -704, 1997.
- ADAMS, R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 1, p. 5-11, 1998.
- ADAMS, J. R. Lessons from Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP) study. **J. Child Neurol.**, v. 15, p. 344-349, 2000.
- ADORNO, E.V. et al. Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador, Bahia, Nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 2, n.1, p. 292-298, 2005.
- AKINBAMI, A. et al. Haematological values in homozygous sickle cell disease in steady state and haemoglobin phenotypes AA controls in Lagos, Nigeria. **BMC Res. Notes**, v. 5, p. 396.
- ALEXANDROV, A.V. et al., for the American Society of Neuroimaging Practice Guidelines Committee. Practice Standards for Transcranial Doppler (TCD) Ultrasound. Part II. Clinical Indications and Expected Outcomes. **J. Neuroimaging**, v. 22, p. 215-224, 2012.
- ALIEFENDIOGLU, D. et al. Do cerebral blood flow velocities change in iron deficiency anemia? **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 29, n. 11, p. 747-51, 2007.
- ANYAEGBU, C.C. et al. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anemia (SCA.). **Eur. J. Hematol.**, v. 60, n. 4, p. 267-269, 1998.
- ATAGA, K.I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemia. **Haematologica**, v. 94, n. 11, p. 1481–1484, 2009.
- AYGUN, B.; Odame, I. A global perspective on sickle cell disease. **Pediat. Blood & Cancer**, v. 59, n. 2, p. 386–390, 2012.
- BALLA, J. et al. Heme, heme oxygenase and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 12, p. 2119-37, 2007.
- BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data. **Am. J. Hematol.**, v. 87, p. 338, 2012.

BANDEIRA, I.C. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB\*S haplotype. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 217-221, 2014.

BEZERRA, M.A. et al. Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, v. 31, p. 83-8, 2007.

BODE, H. **Pediatric Applications of Transcranial Doppler Sonography**. 1. ed. Basel: Springer- Verlag Wien GmbH, 1988. p. 6.

BRANDELISE, S. et al. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, n. 1, p. 15-19, 2004.

BRASS, L.M. et al. Middle cerebral artery blood velocity and cerebral blood flow in sickle cell disease. **Stroke**, v. 22, n. 1, p. 27-30, 1991.

BURKE, G.M. et al. Moyamoya disease: a summary. **Neurosurg. Focus**, v. 26, n. 4, p. E11, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Incidence of Sickle Cell Trait – United States, 2010- 2014. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, December 12, 2014 / 63(49), p. 1155-1158, 2014.

CHISTIYAKOV, D.A., OREKHOV, A.N., BOBRYSHCHEV, Y.V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. **Acta Physiol.**, v. 219, n. 2, p. 382-408, 2017.

COLOMBATTI, R. et al. Cerebral blood velocity is associated with increased leukocyte count and systolic blood pressure in HbSS but not HbSC. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 989, 2015.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; COSTA, F.F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

D'ANDREA, A. et al. Transcranial Doppler ultrasound: Physical principles and principal applications in Neurocritical care unit. **J. Cardiovasc. Echography**, v. 26, p. 28-41, 2016.

DINIZ, D. et al. Prevalence of sickle cell trait and sickle cell anemia among newborns in Federal District, Brazil, 2004-2006. **Cad. Saude Publ.**, v. 25, p. 188- 194, 2004.

DRAWZ, P. et al. Kidney Disease among Patients with Sickle Cell Disease, Hemoglobin SS and SC. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 2, p. 207-215, 2016.

EARLEY, C.J. et al. Stroke in children and sickle-cell disease: Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. **Neurology**, v. 51, n. 1, p. 169-176, 1998.

ENNINFUL-EGHAN, H. et al. Transcranial Doppler screening and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. **J. Pediatr.**, v. 157, n. 3, p. 479–484, 2010.

- FASANO, R.M.; MEIER, E.R.; HULBERT, M.L. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. **Blood Cells Mols Dis.**, v. 54, n. 1, p. 17-25, 2015.
- FATUNDE, O.J. et al. Stroke in Nigerian children with sickle cell disease. **Afr. J. Med. Med. Sci.**, v. 34, n. 2, p. 157-160, 2005.
- GAILLARD, F. **Radiopaedia**. Available at: Radiopaedia.org's Cases. Accessed on: 17 July, 2017.
- GEORGE, I.O.; OPARA, P.I. Sickle Cell Anaemia: A survey of associated morbidities in Nigerian Children. **Afr. J. Haematol. Oncol.**, v. 2, n. 2, p. 187-190, 2011.
- GERALD, B.; SEBES, J.I.; LANGSTON, J.W. Cerebral infarction secondary to sickle cell disease: arteriographic findings. **Am. J. Roentgenol.**, v. 134, p. 1209–1212, 1980.
- GROOSSE, S.D. et al. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. **Am. J. Prev. Med.**, v. 41, n. (6, suppl 4), p. S398-405, 2011.
- GUARDA, C.C. et al. Heme-mediated cell activation: the inflammatory puzzle of sickle cell anemia. **Exp. Rev. Hematol.**, v. 10, n. 6, p. 533-541, 2017.
- HANKINS, J.S. et al. The natural history of conditional transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 142, n. 1, p. 94-99, 2008. Doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07167.x
- HANKINS, J.S. et al. Prevention of conversion to abnormal TCD with Hydroxyurea in sickle cell anemia: A phase III international Randomized clinical Trial. **Am. J. Hematol.**, v. 90, n. 12, p. 1099–1105, 2015.
- HASAN, E.H.; JASIM, T.A. Stroke in Sickle Cell Disease, Risk Factors Comparative Study. **Am. J. Med. Med. Sci.**, v. 6, n. 1, p. 16-22, 2016.
- HENDERSON, J.N. et al. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and silent cerebral infarcts are associated with severe acute chest syndrome in children with sickle cell disease. **Blood**, v. 101, n. 2, p. 415–419, 2003.
- HOKAZONO, M. et al. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between timed- average maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional study. **Sao Paulo Med.**, v. 129, n. 3, p. 134-138, 2011.
- HOPPE, C. et al., for CSSCD investigators Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2391-2396, 2004.
- HOPPE, C. Defining stroke risk in children with sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 128, n. 6, p. 751-766, 2005.

KAUL, D.K.; HEBBEL, R.P. Hypoxia/re-oxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 411–420, 2000.

KELM, M.; SCHRADER, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. **Circ. Res.**, v.66, p. 1561–1575, 1990.

KLABUNDE, R.E. **Cardiovascular Physiology Concepts**. 2. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. ISBN: 9781451113846.

KORDES, U. et al. Homozygous factor V Leiden mutation in sickle cell anemia. **Br. J. Hematol.**, v. 116, n. 1, p. 236-237, 2002.

KOSHY, M.; THOMAS, C.; GODWIN, J. Vascular lesions in the central nervous system in sickle cell disease (neuropathology). **J. Assoc. Acad. Minor Phys.**, v. 1n. 3, p. 71–78, 1990.

KREJZA, J. et al. Suitability of temporal bone acoustic window: conventional TCD versus transcranial color-coded duplex sonography. **J. Neuroimaging**, v. 17, n. 4, p. 311-4, 2007.

KWIATKOWSKI, J.L. et al. STOP Trial Investigators. Elevated blood flow velocity in anterior cerebral artery and stroke risk in sickle cell disease: extended analysis from STOP trial. **Br. J. Haematol.**, v. 134, n. 3, p. 333-339, 2006.

KWIATKOWSKI, J.L. et al, for the STOP 2 study investigators. Effect of transfusion therapy on transcranial Doppler ultrasonography velocities in children with sickle cell disease. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 56, n 5, p. 777-782, 2011.

LAGUNJU, I.; SODEINDE, O. Prospective measurement of stroke incidence in childhood sickle cell disease. **Arch. Dis. Child.**, v. 97, n. (1 suppl), p. A45, 2012. Doi: .1136/archdischild-2012-301885.111.

LAGUNJU, I. et al. Transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia: Clinical and laboratory correlates for elevated blood flow velocities. **J. Clin. Ultrasound**, v. 42, n. 2, p. 89-95, 2014.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. Leukoc. Biol.**, v. 85, n. 2, p. 235-242, 2009.

LAWRENCE, C., FABRY, M.E., NAGEL, R.L. The unique red cell heterogeneity of SC disease: Crystal formation, dense reticulocytes, and unusual morphology. **Blood**, v. 78, n. 8, p. 2104-12, 1991.

LEE, M.T. et al. and for the STOP Study Investigators. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP): extended follow-up and final results. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 847–852, 2006.

LEHMANN, H.; RAPER, A.B. Distribution of sickle cell trait in Uganda, and its ethnological significance. **Nature**, v. 164, n. 4168, p. 494-495, 1949.

- LEITE, A.C. et al. Abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 34, n. 4, p. 307–310, 2012.
- LOBO, C.L. et al. Brazilian guidelines for transcranial Doppler in children and adolescents with sickle cell disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2011.
- MADU, A.J. et al. Stroke prevalence among sickle cell disease patients in Nigeria: a multi-center study. **Afr. Health Sci.**, v. 14, n. 2, p. 446-452, 2014.
- MAKANI, J. et al. Risk factors for high cerebral blood flow velocity and death in Kenyan children with Sickle Cell Anaemia: role of haemoglobin oxygen saturation and febrile illness. **Br. J. Haematol.**, v. 145, n. 4, p. 529-532, 2009.
- MAKANI, J. et al. Mortality in Sickle Cell Anemia in Africa: A Prospective Cohort Study in Tanzania. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e14699, 2011.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P.S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 2013.
- MARINONI, M. et al. Technical limits in transcranial Doppler recording: inadequate acoustic windows. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 23, n. 8, p. 1275-7, 1997.
- McCARTNEY, J.P., THOMAS-LUKES, K.M., GOMEZ, C.R. **Handbook of Transcranial Doppler**. 1. ed. New York: Springer, 1997. P. 15.
- MELO, H.A. et al. Doppler transcraniano em portadores de anemia falciforme: estudo dos parâmetros de fluxo sanguíneo cerebral em crianças de Aracaju, Sergipe. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 66, n. 2b, 360-364, 2008.
- MEMISH, Z.A., OWAIDAH, T.M.; SAEEDI, M.Y. Marked regional variations in the prevalence of sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia in Saudi Arabia: Findings from the premarital screening and genetic counseling program. **J. Epidemiol. Global Health**, v. 1, n. 1, p. 61-68, 2011.
- METIVIER, F. et al. Pathophysiology of anemia: focus on heart and blood vessels. **Nephrol. Dial Transpl.**, v. 15, n. suppl 3, 14-18, 2000.
- MILLER, S.T. et al., cooperative study of sickle cell disease. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **J. Pediat.**, v. 139, p. 385–390, 2001.
- MUNUBE, D. et al. Prevalence of stroke in children admitted with sickle cell anaemia to Mulago Hospital. **BMC Neurol. BMC Series**, v. 16, p. 175, 2016. doi: 10.1186/s12883-016-0704-2.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Clinical alert: periodic transfusions lower stroke risk in children with sickle cell anemia.** Disponível em: [www.nlm.nih.gov/databases/alert/sickle97/html](http://www.nlm.nih.gov/databases/alert/sickle97/html). Acesso em: colocar a data ex. 25 mar. 2016.

NHS SICKLE CELL AND THALASSAEMIA SCREENING PROGRAMME. London: NHS, 2006. Disponível em: [www.sct.screening.nhs.uk](http://www.sct.screening.nhs.uk). Acesso em: colocar a data ex. 25 mar

NICHOLS, F.T., JONES, A.M., ADAMS, R.J. Stroke prevention in sickle cell disease (STOP) study guidelines for transcranial Doppler testing. **J. Neuroimaging**, v. 11, p. 354–362, 2001.

NOLAN, V.G. et al. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood**, v. 106, p. 3264–3267, 2005.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell Disease: rates and risks. **Blood**, v 91, n. 1, p. 288-294, 1998.

OKPALA, I. Sickle Cell Disease and Thalassaemia. In: CAGE, J. (Ed.). **Synopsis of Hematology** Including Blood diseases in the tropics, 1. Ed. Charlston: CreateSpace Publishers, 2010. Chap. 3, p. 47-70.

OKPALA, I. Leukocyte adhesion and pathophysiology of sickle cell disease. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 13, n. 1, p. 40-44, 2006.

OKUMURA, J.V., LOBO, C.L., BONINI-DOMINGOS, C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, p. 71-72, 2013.

OKWI, A.L. et al. An up-date on the prevalence of sickle cell trait in Eastern and Western Uganda. **BMC Hematol.**, v. 10, p. 5, 2010.

OSSEI-YEBOAH, C.T.; RODRIGUES, O. Renal Status of Children with Sickle cell disease in Accra, Ghana. **Ghana Med. J.**, v. 45, n. 4, p. 155–160, 2011.

PETERSON, E.C., WANG, Z., BRITZ, G. Regulation of Cerebral Blood Flow. **Internat. J. Vasc. Med.**, v. 2011, Article ID 823525, 8 pages, 2011.

PIEL, F.B. et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010–2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PloS Med.**, v. 10, p. e1001484, 2013.

POWARS, D. et al. The natural history of stroke in sickle cell disease. **Am. J. Med.**, v. 65, p. 461-471, 1978.

QUINN, C. T., VARISTE, J., DOWLING, M. M. Hemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anemia. **Br. J. Haematol.**, v. 145, n. 4, p. 500–505, 2009.

RODRIGUES, O.W. et al. Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. **J. Pediatr. (Rio J)**, v. 92, n. 6, p. 602-608, 2016.

SARAF, S.L. et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. **Paediat. Respir. Rev.**, v. 15, n. 1, p. 4–12, 2014.

SARRAY, S. et al. Serum IL-6, IL-10, and TNF $\alpha$  levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. **Cytokine**, v. 2, n. 1, p. 43-47, 2015.

SCHÖNING, M. HARTIG, B. Age dependence of total cerebral blood flow volume from childhood to adulthood. **J. Cereb. Blood Flow & Metab.**, v. 16, n. 5, p. 827-833, 1996.

SCHUENKE, M. et al. **Thiemes atlas of neuroanatomy**. 2. ed. New York: Springer, 2016. 600p.

SCOTT, M.R. & SMITH, E.R. Moyamoya disease and moyamoya syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.360, n. 12, p. 1226-1237, 2009.

SELIM, M. et al. The effect of body mass index on cerebral blood flow velocity. **Clin. Auton. Res.**, v. 18, n. 6, p. 331-8, 2008.

SHATAT, I.F. et al. Changes in urine Microalbumin-to-Creatinine Ratio in Children with Sickle Cell Disease over Time. **Front Pediatr.**, v. 4, p. 106, 2016.

SINGH, H. et al. Effective control of sickle cell disease with hydroxyurea therapy. **Ind. J. Pharmacol.**, v. 42, n. 1, p. 32-35, 2010.

SOMMET, J. et al. Clinical and haematological risk factors for cerebral macrovasculopathy in sickle cell disease newborn cohort: a prospective study. **Br. J. Haematol.**, v. 172, n. 6, p. 966-977, 2016.

SWIAT, M. et al. Middle cerebral artery vasospasm: transcranial color-coded duplex sonography versus conventional nonimaging transcranial Doppler sonography. **Crit. Care Med.**, v. 37, n. 3, p. 963-8, 2009.

TAKAHASHI, T. et al. Developmental changes of cerebral blood flow and oxygen metabolism in children. **AJNR Am. J. Neuroradiol.**, v. 20, n. 5, p. 917-922, 1999.

TORRES, L.S. et al. Inflammation in Sickle Cell Disease: Differential and Down-Expressed Plasma Levels of Annexin A1 Protein. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165833, 2016.

THRUSH, A. Technical principles of transcranial Doppler. In: THRUSH, A., HARTSHORNE, T. **Peripheral vascular ultrasound: How, Why, and when**. 2. ed. Michigan: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 235p.

VIEIRA, C. et al. Transcranial Doppler in hemoglobin SC disease. **Pediatric Blood and Cancer**, p. 1-5, 2016.

VILLAGRA, J. et al. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood**, v. 11, n. 6, p. 2166-2172, 2007.

WALLACE, K.L. et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-g and CXCR3 chemokines. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 667-676, 2009.

WANG, W.C. et al., BABY HUG investigators. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1663-72, 2011.

WANG, W.C.; DWAN, K. Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 14, n. 11, CD003146, 2013.

WARE, R.E. et al. Hydroxycarbamide versus chronic blood transfusion for maintenance of transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia-TCD with transfusions changing to hydroxyurea (TWITCH): a multicenter, open label, phase, non-inferiority trial. **Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 661-670, 2016.

WHO. World Health Assembly, 59. **Sickle cell anaemia: report by the secretariat**. In: World Health Assembly fifth-ninth session, provisional agenda item 11.4, 2006, Geneva, Switzerland.

WHO. REGIONAL OFFICE FOR AFRICA. **Sickle-cell disease: a strategy for the WHO Africans Region**. Report of the Regional Director, 06.2010, Geneva, Switzerland.

WHO. **Sickle cell disease and other haemoglobin disorders**. WHO Fact sheet, 01.2011, N°308.

ZHANG, D., Xu, C., MANWANI, D.; FRENETTE, P.S. Neutrophils, Platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801-809, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-618538>.

ZIMMERMAN, S.A. et al. Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 1043-1047, 2007.

## ANEXOS

### ANEXO I: Manuscrito

#### **Cerebral Blood Flow Velocities of Children and Adolescents with Sickle cell Disease: correlation with clinical and hematological profiles.**

Bartholomew Friday Chukwu<sup>1</sup>, Lyra Isa Menezes<sup>2</sup>, Thiago Fukuda<sup>3</sup>, Jamarly Oliveira Filho<sup>3</sup>, Uche Samuel Nndidi<sup>4</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Haematology/Oncology Unit, Department of Paediatrics, University of Nigeria, Nsukka

<sup>2</sup> Pediatric Hematology, Professor Edgard Santos University Hospital (HUPES), Salvador, Bahia, Brazil

<sup>3</sup> Department of Neurology, HUPES, Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.

<sup>5</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Bahia/Laboratory for Hematology, Genetics and Computational Biology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil.

Corresponding author: Bartholomew F. Chukwu

E-mail: chizzy\_bath@yahoo.com

Phone: +2348036757003

Word count:

Abstract = 299, Main text = 4,373

Number of Tables = 5

Number of Figures = 3

Running Title: Cerebral blood velocities of children and adolescents with sickle cell disease.

Keywords: sickle cell disease, cerebral blood flow velocity, transcranial Doppler, children, Salvador.

## List of abbreviations:

ACA	Anterior cerebral artery
ACS	Acute chest syndrome
BMI	Body mass index
CBFV	Cerebral blood flow velocity
CVA	Cerebrovascular accident
HU	Hydroxyurea
ICA	Internal carotid artery
IL	Interleukin
MCA	Middle cerebral artery
PCA	Posterior cerebral artery
SCA	Sickle cell anemia
SCD	Sickle cell disease
SCT	Sickle cell trait
TAMMV	Timed average mean of maximum velocity
TCD	Transcranial Doppler
TNF	Tumor necrosis factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

**Abstract**

**Background:** stroke is a devastating complication of sickle cell disease (SCD). Abnormally high cerebral blood flow velocity (CBFV) is the most important risk factor for development of stroke in these patients, and its detection by transcranial Doppler (TCD) is fundamental in primary stroke prevention. The study aimed at evaluating the CBFV of children and adolescents with SCD in Salvador, detect those at high risk of stroke and correlate the flow velocities with clinical and hematological profiles of the patients.

**Methods:** TCD was performed on subjects aged 2-16 years who fulfilled the inclusion criteria, using a 2 MHz probe placed over the transtemporal windows. The oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) and anthropometric parameters were measured, and clinical and hematological profiles retrieved from their medical records.

**Results:** one hundred and thirty five patients were recruited. The median of timed averaged mean of maximum velocities (TAMMV) was 125cm/s. Patients with sickle cell anemia (SCA) had a significantly higher CBFV (131cm/s) than those with HbSC disease (107cm/s). Only one (0.74%) patient had abnormal cerebral blood flow velocity while 18 (13.33%) had conditional velocities. CBFV correlated inversely with SpO<sub>2</sub>, hemoglobin concentration (Hb) and patient's age, and positively with white blood cells (WBC) and platelet counts. Leukocyte counts, fetal hemoglobin (HbF) and patient's age independently had linear association with CBFV when other variables were kept constant. Previous history of ACS and recurrent bone crises increased the risk of development of high abnormal and conditional velocity.

**Conclusion:** frequency of abnormal CBFV in SCD was low. Younger children and those with SCA had higher TCD velocities and higher risk of developing abnormal TCD result. Low SpO<sub>2</sub>, Hb, and high WBC and platelet counts were associated with high TCD velocities. Previous history of ACS and recurrent bone pain were associated with increased risk of having abnormal and conditional TCD velocity.

**Key words:** sickle cell disease, cerebral blood flow velocity, Transcranial Doppler, children, adolescents, Salvador.

## Introduction

In Brazil, the frequency of sickle cell trait (SCT, HbAS) and prevalence of sickle cell disease (SCD) range from 1.1% to 9.8% and 0.8 to 60 per 100,000 births respectively. The northeastern region has the highest prevalence and the south, the lowest, with estimated 700-1000 children born annually with SCD.<sup>1, 2, 3, 4</sup> Salvador, Bahia, has the highest burden of both the trait and the disease. According to reported by Adorno et al., the frequency of SCT and prevalence of SCD in Salvador was 9.8% and 0.17% respectively while Brazil's ministry of health reported the state of Bahia to have the highest frequency of SCT and prevalence of SCD with estimates of 5.3% or 1:17 and 1 in 650 persons of the population respectively.<sup>5, 6</sup>

HbS in de-oxygenated state is less soluble and tends to polymerize and crystallize inside red blood cells. These polymers elongate and precipitate inside the erythrocytes, distorting the normal biconcave shape and giving rise to various shapes, including the characteristic sickle shape (sickle cell). The abnormally shaped erythrocytes may revert to normal when oxygen saturation improves, as in the lungs. However, with repeated sickling episodes, these cells may remain permanently sickled (irreversible sickled cells) because of damage to the membrane cytoskeleton. These irreversibly sickled cells are susceptible to enhanced hemolysis, resulting in anemia, as well as obstructing the microvasculature with resultant ischemia and tissue damage.<sup>1, 7</sup> Hemolysis and vascular obstruction with ischemia are the main pathophysiological processes resulting in a constellation of symptoms, signs and complications of SCD.

Although, SCD is primarily a red cell disorder, the white blood cells (WBC), platelets and other cellular elements as well as hormonal and environmental factors contribute to its pathogenesis.<sup>8, 9</sup> Vaso-occlusion does not only occur due to passive mechanical obstruction of capillaries by sickle red blood cells, but also by adhesive interplay between sickled and unsickled erythrocytes, neutrophils, monocytes, platelets and vascular endothelium. SCD is also considered as a chronic inflammatory process due to expression of several markers of inflammation such as pro-inflammatory cytokines and chemokines including: interleukin (IL)-6, IL-17 and tumor necrosis factor (TNF).<sup>10</sup> Vaso-occlusion, ischemia and reperfusion injury, hemolysis and release of free hemoglobin molecules, iron and heme result in release of oxidant free radical species such as superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl (.OH), and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>11, 12</sup> These free radicals cause damage and activation of vascular endothelium, activate neutrophils, monocytes, platelets, and erythrocytes; with increased expression of adhesion molecules such as P-selectin, E-selectin,

integrins, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and their ligands.<sup>13, 14</sup> High neutrophil count is associated with severe and more frequent episodes of painful crisis in SCD patients.<sup>15, 16</sup> Studies have also described higher platelets, monocytes and reticulocytes counts and their activation in patients with SCD than their normal controls.<sup>17, 18, 19, 20</sup>

SCD is characterized by acute episodes of illnesses (crises) such as bone pain crisis, acute chest syndrome (ACS), priapism, hemolytic crisis, acute infections; and acute and long-term complications such as cerebrovascular accident (CVA), nephropathy, chronic liver disease, proliferative retinopathy, avascular necrosis of femoral head and chronic leg ulcer. Laboratory findings may include, reduced hemoglobin concentration, and elevated plasma bilirubin, high WBC count with relative neutrophilia in steady state, thrombocytosis, increased reticulocyte count, blood film demonstrating sickled cells, as well as findings relating to specific organ damage.

Cerebrovascular accident (CVA) or stroke is a devastating complication of SCD with medical, psychological, social and economic challenges; and up to 11% of children with SCD are at risk of developing stroke before the age of 20 years and 24% by age of 45 years, with highest incidence occurring between 2-5 years.<sup>21</sup> The incidence of stroke among Brazilian children with SCD ranged from 17.2-27.3%.<sup>22</sup> Proliferative vasculopathy of large intracranial internal carotid arteries and their proximal branches is the pathophysiological basis for development of ischemic stroke in SCD, although large artery occlusion alone cannot explain all the CVAs seen in children with SCD.<sup>23</sup> Micro-infarcts in the deep white matter and diffuse arteriolar thickening have been reported in some neuropathological studies with normal cerebral angiograms in cases of acute clinical stroke.<sup>24, 25</sup> Risk factors for occurrence of stroke in SCD include anemia, leukocytosis, thrombocytosis, previous stroke, silent cerebral infarction, and systemic hypertension. Abnormally high cerebral blood flow velocity is the most important risk factor for development of stroke in these patients.<sup>21, 26</sup> Detection of elevated cerebral blood flow velocity with transcranial Doppler (TCD) is fundamental to primary prevention of stroke in SCD, as it has been shown that TCD screening and subsequent prophylactic blood transfusion of patients at high risk of development of this complication reduces the risk by more than 90%.<sup>27</sup>

Apart from performing TCD to detect elevated cerebral blood flow velocity, are there other parameters that may indicate an increased cerebral blood flow velocity in children with SCD? We hypothesized that young age, low hemoglobin; low hemoglobin oxygen saturation and elevated

WBC, reticulocyte and platelet counts, as well as low fetal hemoglobin (HbF) concentration are associated with increased cerebral blood flow velocity and increased risk of stroke in SCD patients. The present study aimed at evaluating the cerebral blood flow velocities of children and adolescents with SCD, detecting those at high risk of developing CVA, and correlating the cerebral blood flow velocities with hematological and clinical profiles of the patients.

### **Patients and Methods**

This observational, cross sectional study was conducted at the Pediatric Hematology outpatient clinic of Professor Edgard Santos University Hospital, Salvador, Brazil, between March 2016 and Feb. 2017. The study was approved by the Research Board of the Secretary of Health of the state of Bahia and written informed consent obtained from caregivers and assent from patients were appropriate. Patients included in the study were those aged 2-16 years, confirmed to have SCD, in a steady state and who or whose parents/ caregivers gave informed consent while patients with past history of stroke or on prophylactic blood transfusion or had received blood transfusion for any other reason within the preceding 3 months were excluded. Subjects who fulfilled the inclusion criteria were recruited consecutively as they present to the clinic for TCD. Clinical risk factors of stroke including past history of stroke, ACS or pneumonia, recurrent bone pain and priapism were obtained from patients or caregivers. The history was verified from the patients' medical records. The steady state hematological parameters and use of hydroxyurea (HU) were also obtained from patients' medical records. The steady state hematological parameters were taken as measures estimated within the preceding 3 months without blood transfusion; and included, hemoglobin concentration, hematocrit, reticulocyte, WBC, neutrophil, monocyte, and platelet counts and HbF concentration.

The arterial oxygen saturation was determined with pulse oximeter (Geratherm Medical, Germany) placed on the right index finger of the patient while the weight (Kg) and height (M) were measured with a stadiometer (Welmy industry and comercial Ltd). The body mass index (BMI) was calculated from the formula:  $BMI = \text{weight (Kg)} / \text{height (m)}^2$ . TCD screening was performed, using a single device Doppler probe (2MHZ) transducer (Sonatek, Viasys Healthcare and Cardinal Health, USA) on the trans-temporal windows. The conventional TCD was performed as recommended in the Stroke prevention trial in sickle cell anemia (STOP) and the Brazilian guidelines for TCD in children and adolescents with SCD.<sup>28, 29</sup> The indications, procedures,

advantages and risks of the examination were explained to the patients and/or caregivers before the examination.

The examination was done while patient was in supine position, awake, calm, and alert but not allowed to sleep because increase in CO<sub>2</sub> during sleep can increase cerebral blood flow and velocity. While patient was lying supine and looking contra laterally, the examiner sat at the head of the bed/stretchers with easy access to the instruments. The trans-temporal window was located just above the zygomatic ridge between the lateral canthus of the eye and the pinna of the ear. The lubricated 2MHz frequency TCD probe was placed over the acoustic window to insonate the basal cerebral arteries. The arteries were identified based on relative direction of the probe within a specific acoustic window, direction of blood flow relative to the probe, and depth of insonation. The distance from the transducer to the point where flow is being sampled is termed the 'depth' and is usually displayed on the screen of TCD machine. The distal internal carotid artery (ICA) or its bifurcation was identified at depths of 55 to 65mm with simultaneous flow away and towards the probe. The middle cerebral artery (MCA) was identified at depths of 35 to 55mm with blood flow towards the probe while the anterior cerebral artery (ACA) was viewed at depths of 60 to 70mm with blood flow away from the probe. Both audible and visual signals of the Doppler wave form were assessed with the aim of recognizing turbulence and other audible clues that suggest high velocities; and with the goal of obtaining the "cleanest," sharpest and high velocity signal. The time averaged mean of maximum velocities (TAMMV) in the proximal MCA artery were recorded from both hemispheres according to the STOP protocol for SCD. 28 The higher value of TAMMV from the right and left MCA was recorded as patient's cerebral blood flow velocity. The classification of TCD result was as described in the STOP trial. 28

The data was analyzed with statistical software (STATA 10, College Station, Tex: Stata Corp) and (SPSS 20.0, Armonk, NY: IBM Corp). Interval variables were presented as means and standard deviations for parametric variables or median and range for non-parametric variables. Categorical variables were presented in form of tables, proportions and percentages. Test of significance was assessed using Student's-T test for parametric interval variables and Mann Whitney test for non-parametric variables. Chi-square test or Fischer's exact test was used to test for significant difference between categorical variables. Correlations were assessed using Spearman's correlation coefficients. Linear regression analysis was used to establish associations between dependent and independent variables. Relative risk of having abnormal or conditional TCD result was calculated

for those that had history of clinical risk factors under study. Test of significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Patients' Characteristics**

One hundred and forty eight TCD screenings were performed. However, seven of the screenings were on patients who were on prophylactic blood transfusion or have been transfused within the past three months, and were therefore excluded. The remaining 141 screenings were performed among 135 subjects. For those that had repeat screen, the last was taken as their TCD result. The subjects comprised 74 (54.8%) females and 61 (45.2%) males with median age of 8 years (2-16). Ninety three (68.9%) of the patients had HbSS genotype, 41 (30.4%) had HbSC and one (0.7%), S $\beta$ + thalassemia genotype. Fifty one (37.8%) of the patients were taking HU as at the period of TCD screening for various indications, such as recurrent bone pain, past history of acute chest syndrome, or previous abnormal TCD report. The median weight, height and body mass index (BMI) of the patients were 23.6 (11-75.2) kg, 1.3 (0.8-1.8) M and 16.3 (10.7- 27.3) Kg/M<sup>2</sup> respectively. Table 1 summarizes the patients' demographic characteristics.

### **Transcranial Doppler screening**

The median of the TAMMV was 125 cm/s (74.4-202) cm/s. One patient (0.74%) had abnormal result while 18 (13.33% had conditional results. None had low TCD result (Figure 1).

The females had a median TAMM velocity of 125.5 (74.7-199) cm/s in comparison with the males' 122 (74.4-202) cm/s, with no significant difference (Mann-Whitney test,  $p = 0.5$ ). One (1.6%) of the males had abnormal result, 8 (13.1%) had conditional results while 10 (13.5%) of the females also had conditional results, with no significant difference (Fischer's exact,  $p = 0.7$ ).

The age group 6-9 years had the highest median cerebral blood flow velocity of 131cm/s while the 14-16 year olds had the lowest velocity of 111cm/s (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.01$ ) as shown in table 2. While the only abnormal TCD result was recorded in the age group 2-5 years, 88.9% (16/18) of the conditional results was in the under 10.

Median CBFV did not differ significantly (Wilcoxon signed-rank test:  $z = -0.9$ ,  $p = 0.4$ ) between the right (118cm/s) and left (120cm/s) middle cerebral arteries, nor among patients on (128cm/s) or not on (121cm/s) HU therapy (Mann-Whitney test:  $p = 0.4$ ).

Comparing the cerebral blood flow velocities among the different genotypes, it was observed that patients with SCA had higher median TAMMV (131cm/s) compared to those with HbSC (107cm/s) or HbS $\beta$ -thalassemia (109cm/s) disease, with a statistically significant difference (Kruskal-Wallis test,  $p= 0.0001$ )-figure 2. The abnormal and conditional velocities were recorded only among the SCA patients.

The study compared the hemoglobin oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) among the patients in relation to their TCD results. It was observed that patients with abnormal or conditional results had lower SpO<sub>2</sub> (< 95%) compared to those with normal result. The patients with abnormal result had median SpO<sub>2</sub> of 92% while those with conditional and abnormal TCD results had SpO<sub>2</sub> of 94% and 97% respectively. This difference was statistically significant (Kruskal-Wallis test:  $p= 0.0002$ ). Patients with abnormal or conditional TCD results also had lower mean hemoglobin concentration of 6.9g/dl and 7.8 (1.1) g/dl respectively compared with those with normal results of 9.2 (1.4) g/dl. One-way analysis of variance (ANOVA) indicated a statistically significant difference in the mean hemoglobin concentrations (ANOVA:  $F= 5.58$ ,  $p= 0.005$ ). Percentage of HbF was lower in patients with abnormal (3.3%) or conditional (6.3%) TCD results than those who had normal (9.2%) results, but the difference was not significant (Kruskal-Wallis test:  $p= 0.05$ ). Following a similar pattern, there was no significant difference (Kruskal-Wallis test:  $p= 0.1$ ) in the reticulocyte count among patients with normal (4.4%), conditional (8.3%) or abnormal (3.6%) TCD results. It was observed that patients with conditional or abnormal TCD results had higher white cell and platelet counts than those with normal results as shown in table 3. Test of significance (Kruskal-Wallis test) also indicated that the differences in WBC and platelet counts were statistically significant.

As shown in table 4 and figures 3a-3h, Spearman's correlation analysis indicated that patients' age, oxygen saturation, and hematocrit negatively correlated with cerebral blood flow velocity. Total leukocyte, neutrophil, monocyte, platelet, and reticulocyte counts had positive correlation with CBFV. These findings demonstrate that increased CBFV is associated with younger age, low SpO<sub>2</sub>, low hematocrit/hemoglobin and elevated leukocyte, neutrophil, monocyte, platelet, and reticulocyte counts. There was no correlation between HbF concentration and CBFV.

After data transformation of the non-parametric variables, a multiple linear regression model was used to assess for a linear relationship between cerebral blood flow velocity and the independent variables. This regression model showed that the independent variables statistically significantly

predicted the dependent variable,  $F(10, 60) = 8.87, p = 0.0000$ ), although responsible for only 60% of the variability of cerebral blood flow velocity ( $R^2 = 0.5964$ ). Young age and low HbF had negative association with CBFV while total leukocyte, neutrophil, and monocyte counts independently had positive association with CBFV, when other variables were held constant ( $p = 0.002, 0.002, 0.03, 0.000, \text{ and } 0.007$  respectively)-Table 5.

A risk analysis showed that patients who have had ACS or pneumonia in the preceding year are six times at risk of having abnormal or conditional TCD result compared to those without the complication. Out of the 23 patients that suffered ACS, 12 had altered velocity (Relative risk= 6.7;  $X^2 = 33.28, p = 0.000, 95\% \text{ CI} = 3.4463-12.8711$ ). In the same vein, those who have had recurrent vaso-occlusive bone pain crises have two times the risk of having abnormal or conditional TCD result as those without the complication (Relative risk= 2.0633,  $X^2 = 13.83, p = 0.0002, 95\% \text{ CI} = 1.5891-2.6790$ ). No case of priapism was recorded in the present study. Therefore, it was not possible to assess the risk imposed by this complication on development of altered TCD result.

## Discussion

Identification of children with SCD at high risk of development of CVA is a monumental progress in the prevention of stroke and management of children with SCD in general. Since the great revelation from STOP clinical study in the late 90s with TCD and institution of prophylactic blood transfusion program, the incidence of stroke in these children has reduced, compared to the pre-TCD era.<sup>27,30</sup>

In this study, the prevalence of abnormal TCD result was 0.74% and 13.33% for conditional result. This was comparable to abnormal results of 1.6% and 2.6 % reported by Hokazono et al and Melo et al., as well as that by Leite et al. in different parts of Brazil.<sup>31,32,33</sup> However, it was lower than that reported in Nigeria and Iraq by Lagunju et al and Hasan et al.<sup>34,35</sup> The difference in prevalence could have resulted from differences in access to prophylactic blood transfusion for primary stroke prevention over the years. The guideline for TCD in children and adolescents with SCD in Brazil recommended transfusion regimens of three to six weeks interval for patients who have had two consecutive abnormal TCD results of at least two weeks interval for primary stroke prevention. Although the present study did not include children on prophylactic blood transfusion nor their pre-transfusion TCD results, studies have proved that prophylactic blood transfusion reverses abnormal TCD velocity.<sup>36</sup> The differences in prevalence could also be due to differences in the

number of patients screened or other factors including genetic. Genetic factors associated with increased risk of stroke in SCD include the haplotype, co-inheritance of alpha thalassemia, persistence of HbF production as well as inheritance of genes involved in inflammation, hypoxia, adherence molecules and coagulation.<sup>37</sup>

There is tendency for conditional TCD velocity to convert to abnormal result, which will increase the risk of stroke, and the consequences may be unpalatable for affected patients and their families, as well as the health system, especially in developing nations. It is therefore imperative that measures be put in place to avert this conversion.<sup>38</sup> Apart from 3-6 monthly monitoring of TCD velocity in those with conditional results, no intervention measure is yet recommended, although some researchers have demonstrated the effectiveness of HU in preventing conversion of conditional TCD velocity to normal, thereby reducing the risk of stroke in children with SCD.<sup>39</sup> Patients with SCA had higher TCD velocity compared to other genotypes. This was in agreement with report by Hokazono et al. who also reported statistically significant higher TCD velocities in SCA patients compared to other genotypes.<sup>32</sup> In the present study, all the abnormal and conditional TCD results were from patients with SCA. Vieira et al. observed also that patients with SCA had significantly higher TAMM velocities compared to HbSC disease patients and suggested a lower cut-off point for the later patients.<sup>40</sup> The group reported a prevalence of abnormal TCD result in 7.2% of SCA patients compared to 0.7% among patients with HbSC disease. However, the number of patients screened by this group was more than that in the present study and could account for the higher prevalence. SCA is a more severe type of SCD compared to other genotypes.<sup>41</sup> Apart from higher prevalence of abnormal or conditional TCD velocity and higher risk of CVA, patients with SCA have higher rates of hemolysis, lower hemoglobin concentrations, lower oxygen saturations, and cardiac and other complications when compared with other genotypes.<sup>42</sup> In a comparative study of chronic kidney disease among SCD patients, it was observed that microalbuminuria was more prevalent in SCA patients than those with HbSC disease and SCA patients had lower glomerular filtration rate (GFR) than HbSC counterparts.<sup>43</sup> SCA and HbS $\beta$ 0 -thalassemia generally present most severe clinical and hematological symptoms while HbSC and HbS $\beta$ + -present less severe disease, although with exception of sickle cell retinopathy that is more in the latter group.

Vasculopathy in SCD is driven by hemolysis, neutrophil-endothelial cell interactions and chronic inflammation. These tend to be aggravated in individuals with SCA than HbSC. Red blood cell

count, total hemoglobin, hematocrit, as markers of anemia and reticulocyte count, circulating lactate dehydrogenase, aspartate amino transaminase and unconjugated bilirubin, as markers of hemolysis; as well as proinflammatory cytokines, leukocytes and platelets counts are higher in individuals with SCA than HbSC disease.<sup>44</sup> The predominance of these markers in SCA explains why they have greater severity of symptoms and complications and most likely, why all the abnormal and conditional TCD results were observed in SCA patients in the present study. This study also observed that the age group with the highest median of TAMM velocity was 6-9 years. Thereafter, the velocity decreased with increasing age. This trend was in agreement with that reported by Lagunju et al and Makani et al. among SCA patients and conformed to the general pattern of cerebral blood velocity even in children without SCD.<sup>34, 45</sup> According to a study by Schöning et al., cerebral blood flow velocity, increases markedly from 3 years of age and peaks at about the age of 6 years, and gradually decreasing until 15 years when it reaches a constant value.<sup>46</sup> Brass et al. also observed that cerebral blood flow reaches maximum at about the 6th year of life, with a direct relationship between it and blood flow velocity.<sup>47</sup> This study also established a significant inverse correlation between cerebral blood flow velocity and patient's age. This trend, in combination with other factors such as genetic and environmental factors could be the reason why sickle cell cerebral vasculopathy, elevated cerebral blood flow velocity, and stroke are commoner in younger children with SCD. Other complications of SCD commoner in the younger age group include ACS, splenic sequestration and parvovirus B19 infection with aplastic crisis. These complications have a common association with infection, either viral or bacterial.<sup>48, 49, 50</sup> Therefore, it may be conceivable to think that sickle cell vasculopathy is also related to infections among this age group. Further studies are required to prove or debunk this conception.

A significant negative correlation was noted between cerebral blood flow velocity and peripheral oxygen saturation, hemoglobin concentration and hematocrit. This finding concurred with previous studies.<sup>34, 45, 51</sup> Blood desaturation impairs oxygen delivery to the cerebral tissue and predisposes to cerebrovascular accident. Patients with SCD have chronic anemia arising from chronic hemolysis and recurrent infections. Hemoglobin is the oxygen transporting protein and low concentration is associated with low oxygen carrying capacity and therefore low oxygen saturation. In anemia and desaturation, the circulatory system responds by increasing cardiac output, which increases cerebral blood flow through increase in blood flow velocity.<sup>52</sup> Increase blood flow triggers turbulent flow especially at point of stenotic vasculopathy, which causes more

vascular endothelial damage, inflammation, hyperplasia and hypertrophy of vascular smooth muscle, worsening stenosis, and culminating in cerebral ischemia, and increased risk stroke.<sup>53</sup> Maintaining a stable hemoglobin concentration at or close to 10g/dl by transfusions or drugs that increase the level of HbF and hemoglobin such as HU reduces the risk of abnormal cerebral blood velocity and stroke in children with SCD. Increased hemoglobin level improves oxygen transport and delivery to the brain, thereby reducing the risk of stroke. Chronic transfusion increases the normal hemoglobin level, reduces hypoxia and percentage of HbS (< 30%) and improves oxygen saturation and delivery to cerebral and other tissues, as well as removing sickle red cells from circulation.

The positive correlation between cerebral blood velocity and leukocyte, neutrophil and monocyte counts, platelet count and reticulocyte could be ascribed to the fact that these cells are active participants in the chronic inflammatory process in SCD. Several studies have shown greater elevated counts and activation of these cells in patients with SCD, and more so in those with complications of the disease such as vasculopathy.<sup>19, 54</sup> Reticulocyte count is an indirect marker of intravascular hemolysis, a major pathological process in SCD in which free hemoglobin and heme are released into the circulation, with consequent scavenging of nitric oxide, endothelial injury, elaboration of proinflammatory cytokines and cellular adhesion molecules. The WBC in the multiple linear regression model independently predicted cerebral blood flow velocity, a major risk factor in development of CVA in children with SCD. Study by Conran and colleagues observed that severity of SCD is associated with increased WBC count while a reduction ameliorates the severity of the disease.<sup>7</sup>

In the multiple linear regression model, patient's age, total WBC, absolute neutrophil, monocyte counts, and HbF, were independently associated with cerebral blood flow velocity. Different studies have reported hematocrit and SpO<sub>2</sub> as independent predictors. Quinn et al observed inverse relationship between TCD velocity and SpO<sub>2</sub> and hematocrit.<sup>51</sup> Also in the multivariate model by Makani et al. the group predicted TCD velocity with patient's age, SpO<sub>2</sub> and history of fever and observed that low SpO<sub>2</sub> ≤ 95% and a history of fever was associated with high cerebral blood flow velocity.<sup>45</sup> There is a dearth of information on a direct relationship between cerebral blood flow velocity and WBC, although Colombatti et al recently report an association between cerebral blood flow and increased leukocyte count.<sup>55</sup> The final consequence of cerebral vasculopathy in SCD is vascular stenosis, which results from smooth vascular smooth muscle remodeling,

hyperplasia and hypertrophy. All these result from chronic inflammation, which is directly or indirectly triggered by hemolysis, adherence of sickle red cells and other cells to vascular endothelium, elaboration of proinflammatory cytokines and activation of proinflammatory cells.

56

Children who had suffered ACS/pneumonia or recurrent bone pain crises had higher probability of having an abnormal or conditional cerebral blood flow velocity. ACS is an acute illness characterized by fever, acute respiratory symptoms, new pulmonary infiltrates on chest X-ray and hypoxia. This complication may result from pulmonary infection (pneumonia) or fat embolism from necrotic bone infarction, resulting in fall in pulmonary oxygen tension, oxygen desaturation, sickle hemoglobin polymerization, red blood cell sickling with consequent chain of pathological processes leading to hemolysis and inflammation.<sup>49</sup> ACS is a known risk factor of stroke and other encephalopathies in patients with SCA.<sup>21, 57</sup> Pulmonary hypoxia from ACS can predispose to reduction in delivery of oxygenated blood to cerebral tissues with resultant cerebral vascular endothelial injury, cerebral arterial smooth muscle modeling, stenosis with cerebral ischemia and stroke. Recurrent vaso-occlusion and pain with subsequent reperfusion injury, endothelial activation, inflammation and vascular smooth muscle hyperplasia and hypertrophy predisposes to cerebral vessel stenosis and increased risk of elevated cerebral blood flow velocity and ischemic stroke in sickle cell disease.

**Conflict of interest:** The authors declare that they do not have any conflict of interest in the study.

**Acknowledgements:** The authors wish to acknowledge the immense services rendered by the nurses of Pediatric outpatient unit of Professor Edgard Santos University Hospital, Salvador, Brazil in sorting out the patients and their medical records. We also wish to thank all the resident doctors in the unit for their crucial role in the success of the study.

## References

1. Okumura JV, Lobo CL, Bonini-domingos CR. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013; 35: 71-72.

2. Lobo CL, Cançado RD, Leite AC et al. (2011). Brazilian guidelines for transcranial Doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 3(1): 43-8.
3. Bezerra MA, Santos, M.N, Araujo A.S et al. Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin* 2007; 31: 83-8.
4. Sommet J, Alberti C, Couque N et al. Clinical and haematological risk factors for cerebral macrovasculopathy in sickle cell disease newborn cohort: a prospective study. *Br J Haematol.* 2016; 172(6): 966-77. doi: 10.1111/bjh.13916.
5. Adorno EV, Couto FD, Moura JP et al. Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador, Bahia, Nordeste do Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2005; 21(1): 292-298.
6. Rodolfo DC, Joice AJ. Sickle cell disease in Brazil. *Rev. Brass. Hematol. Hemoter* 2007; 29(3): 203-206.
7. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. (2009). Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin.* 2009; 33(1): 1-16. doi: 10.1080/03630260802625709.
8. Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood.* 2013; 122(24): 3892–3898. doi: 10.1182/blood-2013-05-498311.
9. Okpala I. Leukocyte adhesion and pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(1): 40-44.
10. Bandeira IC, Rocha LB, Barbosa MC et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB\*S haplotype. *Cytokine.* 2014; 65(2): 217-221.
11. Vilas-Boas W, Cergueira BA, Pitanga TN et al. Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2012; 3(4A): 538-550. doi: 10.4236/abb.2012.324071.
12. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. (2014). Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood* 2014; 123(24): 3818-3827.
13. Matsui MN, Borsig L, Rosen SD, Yaghamai M, Varki A, Embury SH. P-selectine mediates adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood.* 2001; 98: 1955-1962.
14. Robert AS, Fames RE, Anjali K, Melissa J, Timothy MW.  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin Expression on Sickle Reticulocytes: Vascular Cell Adhesion molecule-1-Dependent Binding to Endothelium. *Blood.* 1993; 82: 1891-1899.
15. Anyaegbu CC, Okpala I, Akren'Ova YA, Salimonu LS. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anemia (SCA.) *Eur J Hematol.* 1998; 60(4): p. 267-269.
16. Adler BK, Salzman DE, Carabasi MH, Vaughan WP, Reddy VV, Prchal J. Fatal sickle cell crisis in after granulocyte colony-stimulating factor administration. *Blood.* 2001; 97(10): 3313-4.
17. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. (2010). Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood.* 2010; 96(7): 2451-2459.

18. Keegan PM, Surapaneni S, Platt MO. Sick cell disease activates peripheral blood mononuclear cells to induce cathepsins K and V activity in endothelial cells. *Anemia*, 2012, ID. 201781.
19. Akinbanmi A, Dosunmu A, Adediran A, Oshinaike O, Adebola P, Arogundade O. Haematological values in homozygous sickle cell disease in steady state and haemoglobin phenotypes AA controls in Lagos, Nigeria. *BMC Research Notes* 2012; 5: 396. doi: 10.1186/1756-0500-5-396.
20. Brousse V, Colin Y, Pereira C et al. Erythroid adhesion molecules in sickle cell anaemia infants: Insights into early pathophysiology. *EBioMedicine*. 2015; 2(2): 154–157. doi: 10.1016/j.ebiom.2014.12.006.
21. Ohene-Frenpong K, Weiner SJ, Sleeper LA et al. (1998). Cerebrovascular accidents in sickle cell Disease: rates and risks. *Blood* 1998. 91(1): 288-294.
22. Rodrigues DOW, Ribeiro LC, Sudário LC et al. Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. *J Pediatr (Rio J)*. 2016; 92(6): 602-608.
23. Fasano R M, Meier ER, HULBERT, M. L. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2015; 54: 17 -25.
24. Gerald B, Sebes JI. LANGSTON, J.W. Cerebral infarction secondary to sickle cell disease: arteriographic findings. *Am J Roentgenol* 1980; 134: 1209–1212.
25. Koshy M, Thomas C, Godwin J. Vascular lesions in the central nervous system in sickle cell disease (neuropathology). *J Assoc Acad Minor Phys*. 1990; 1(3): 71–78.
26. Kwiatowski JL, Granger S, Brambilla DJ et al. and STOP Trial Investigators. Elevated blood flow velocity in anterior cerebral artery and stroke risk in sickle cell disease: extended analysis from STOP trial. *Br J Haematol*. 2006; 134(3): 333-9.
27. Adams R J, McKie V C, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998; 339(1): 5-11.
28. Nichols FT, Jones AM, Adams RJ. Stroke prevention in sickle cell disease (STOP) study guidelines for transcranial Doppler testing. *J Neuroimaging*. 2001; 11: 354–362.
29. Lobo CL, Caçado RD, Leite AC et al. Brazilian guidelines for transcranial Doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011; 33(1): 43-48.
30. Enniful-Eghan H, Moore RH, Ichord R, Smith-Whitely K. & Kwiatowski JL. Transcranial Doppler screening and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 2010; 157: 479–484. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.03.007.
31. Melo HA, Barreto-Filho JAS, Prado RCP, Cipolotti R. Doppler transcraniano em portadores de anemia falciforme: estudo dos parâmetros de fluxo sanguíneo cerebral em crianças de Aracaju, Sergipe. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2008; 66(2b): 360-364. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2008000300015>.
32. Hokazona M, Silva GS, Silva EM, Braga JP. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between timed-average maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional study. *Sao*

- Paulo Med. 2011; 129(3): 34-138. Available at <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-31802011000300003>.
33. Leite AC, Carvalhaes de Oliveira RV, Gomes de Moura P, Silva CM, Lobo C. Abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012; 34(4): 307–310. doi: 10.5581/1516-8484.20120078.
  34. Lagunju I, Sodeinde O, Brown B, Akinbami F, Adedokun B. Transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia: Clinical and laboratory correlates for elevated blood flow velocities. *J Clin Ultrasound.* 2014; 42(2): 89-95. doi: 10.1002/jcu.22099.
  35. Hasan EH, Jasim TA. Stroke in Sickle Cell Disease, Risk Factors Comparative Study, *American Journal of Medicine and Medical Sciences* 2016; 6(1): 16-22. Doi: 10.5923/j.ajmms.20160601.03.
  36. Kwiatowski JL, Yim E, Miller S, Adams RJ, for the STOP 2 study investigators. Effect of transfusion therapy on transcranial Doppler ultrasonography velocities in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2011; 56(5): 777-782.
  37. Hebbel RP, Vercellotti, GM, Nath KA. A Systems Biology Consideration of the Vasculopathy of Sickle Cell Anemia: The need for Multi-Modal Chemo-Prophylaxis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009; 9(4): 271-292.
  38. Hankins JS, Fortner GL, McCarville MB et al. The natural history of conditional transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2008; 142(1): 94-99. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07167.x
  39. Hankins JS, McCarville MB, Rankine-Mullings B et al. Prevention of conversion to abnormal TCD with Hydroxyurea in sickle cell anemia: A phase III international Randomized clinical Trial. *Am J Hematol.* 2015; 90(12): 1099–1105. doi: 10.1002/ajh.24198.
  40. Vieira C, de Oliveira CNC, de Figueiredo LAB, et al. Transcranial Doppler in hemoglobin SC disease. *Pediatric Blood & Cancer.* 2017; 64, e26342. <https://doi.org/10.1002/pbc.26342>
  41. Saraf SL, Molokie RE, Mehdi NM et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatr Respir Rev.* 2014; 15(1): 4–12. doi: 10.1016/j.prrv.2013.11.003.
  42. Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood,* 2005;106: 3264–3267.
  43. Drawz P, Ayyappan S, Nouraie M et al. Kidney Disease among Patients with Sickle Cell Disease, Hemoglobin SS and SC. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016; 11(2): 207-15. doi: 10.2215/CJN.03940415.
  44. Torres LS, Okumura JV, Silva DG et al. Inflammation in Sickle Cell Disease: Differential and Down-Expressed Plasma Levels of Annexin A1 Protein. *PLoS ONE.* 2016; 11(11): e0165833. doi:10.1371/journal.pone.0165833.
  45. Makani J, Kirkham FJ, Komba A et al. Risk factors for high cerebral blood flow velocity and death in Kenyan children with Sickle Cell Anaemia: role of haemoglobin oxygen saturation and febrile illness. *Br J Haematol.* 2009; 145(4); 529-532.
  46. Schöning M & HARTIG B. Age dependence of total cerebral blood flow volume from childhood to adulthood. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1996; 16(5): 827-833.

47. Brass LM, Prohovnik I, Pavlakis SG, De Vivo DC, Piomelli S, Mohr JP. Middle cerebral artery blood velocity and cerebral blood flow in sickle cell disease. *Stroke* 1991; 22(1): 27-30.
48. Mallouh AA, Qudah A. Acute splenic sequestration together with aplastic crisis caused by human parvovirus B19 in patients with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1993; 122(4): 593-5.
49. Dean D, Neumayr L, Kelly DM et al. Chlamydia pneumoniae and acute chest syndrome in patients with sickle cell disease. *J Pediatr Oncol*. 2003; 25(1): 46-55.
50. Yates AM, Hankins JS, Morther NA, Aygun B, Ware RE. Simultaneous acute splenic sequestration and transient aplastic crisis in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 53(3): 479-481. doi: 10.1002/pbc.22035.
51. Quinn CT, Variste J, Dowling MM. Hemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anemia. *Br J Haematol*. 2009; 145(4): 500–505. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07652.x.
52. Aliefendioglu D, Yilmaz S, Misirlioglu ED, Saygi S, Ozdogan S, Kocak U. Do cerebral blood flow velocities change in iron deficiency anemia? *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007; 29(11): 747-51.
53. Chistiakov DA, Orekhov A.N, Bobryshev YV. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017; 219(2): 382-408. Doi: 10.1111/apha.12725.
54. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 2006; 110(6): 2166-2172. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-061697>.
55. Colombatti R, Padayachee S, MacMahon C, Momi S, Hemmaway CJ, Inusa B. Cerebral blood velocity is associated with increased leukocyte count and cystolic blood pressure in HbSS but not HbSC. *Blood*. 2015; 126(23): 989. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/989>.
56. Rothman SM, Fulling KH, Nelson JS. Sickle cell anemia and central nervous system infarction: a neuropathological study. *Ann Neurol*. 1986; 20(6): 684-90.
57. Henderson JN, Noetzel MJ, McKinstry RC, White DA, Armstrong M, DeBaun MR. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and silent cerebral infarcts are associated with severe acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Blood* 2003; 101(2): 415–419.

Table 1 Patients' characteristics.

Variable	N	Percent	Cumulative percent
<b>Sex</b>			
Male	61	45.2	45.2
Female	74	54.8	100.0
Total	135	100.0	
<b>Age</b>			
2-5	41	30.4	37.4
6-9	43	31.8	62.2
10-13	27	20.0	82.2
14-16	24	17.8	100.0
Total	135	100.0	
<b>Genotype</b>			
SS	93	68.9	68.9
SC	41	30.4	99.3
S $\beta$ -thalassemia	1	0.7	100.0
Total	135	100.0	
<b>Use of hydroxyurea</b>			
Yes	51	37.8	37.8
No	84	62.2	100.0
Total	135	100.0	

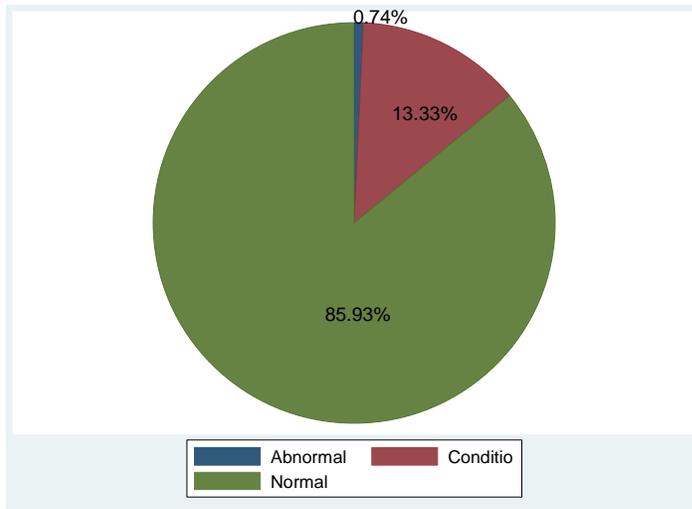


Fig. 1 Prevalence of normal, conditional and abnormal cerebral blood flow velocities.

Table 2 TCD results based on patients' age.

Age category (years)	TCD result				
	N (%)	Median (cm/s)	Normal (%)	Conditional (%)	Abnormal (%)
2-5	41 (30.4)	127.0	32 (23.7)	8 (5.9)	1(0.7)
6-9	43 (31.8)	131	35 (25.9)	8 (5.9)	0 (0)
10-13	36 (26.7)	121.5	26 (19.3)	1 (0.7)	0 (0)
14-16	15 (11.1)	111	23 (17.0)	1 (0.7)	0 (0)
P		0.01			

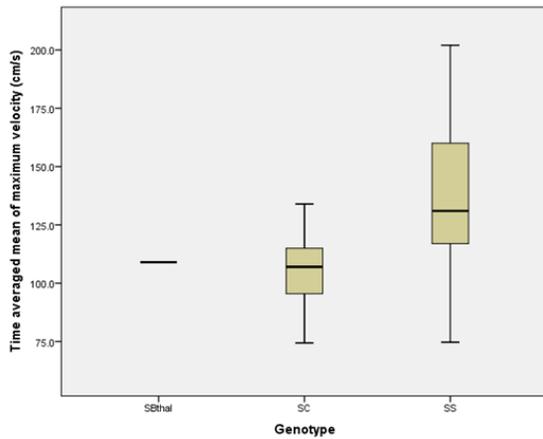


Fig.2 Cerebral blood flow velocities of patients according to their genotype

Table 3 Hematological variables and SpO2 according to TCD result.

TCD	Hct (%)	Hb (g/dl)	SpO2 (%)	WBC (/L)	ANC (/L)	AMC (/L)	Platelets (/L)	Retics (%)	HbF (%)
Normal	27.4	9.2	97	9200	5388	727	369148	3.6	9.2
Cond	23.2	7.8	94	1425	8216	1388	538300	8.3	6.3
Abnormal	21	6.9	92	1230	6396	1250	529000	4.4	3.2
P value	0.008	0.005	0.0002	0.01	0.004	0.0001	0.0003	0.1	0.05

Hct, Hematocrit; Hb, Hemoglobin; Retics, Reticulocyte count; HbF, Fetal hemoglobin; ANC, Absolute neutrophil count; AMC, Absolute monocyte count.

Table 4 Correlation between CBFV and patients' hematological indices and SpO<sub>2</sub>

Variable	N	Spearman $\rho$	P value
Age	135	-2.0	0.02
SpO <sub>2</sub>	135	-0.35	0.0001
Hemoglobin	75	-0.50	0.0000
Hematocrit	75	-0.50	0.0000
Reticulocyte count	72	- 0.51	0.0000
HbF	72	0.03	0.8
Total WBC	75	0.34	0.003
Platelet count	75	0.34	0.003
ANC	75	0.30	0.01
AMC	75	0.53	0.0000

ANC, absolute neutrophil count; AMC, absolute monocyte count; HbF, fetal hemoglobin; CBFV, cerebral blood flow velocity.

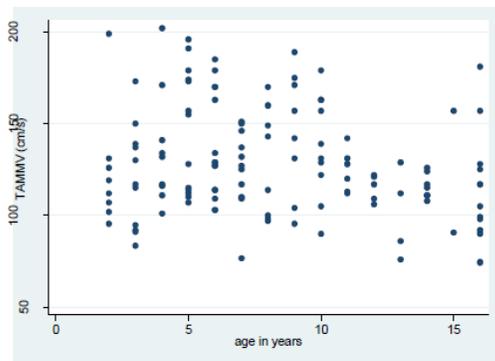


Fig. 3a Correlation between CBFV and age of patient.

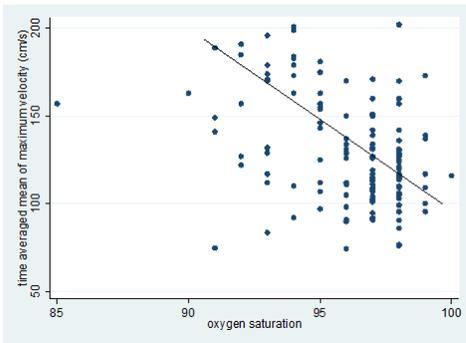


Fig. 3b: Correlation between CBFV and oxygen saturation.

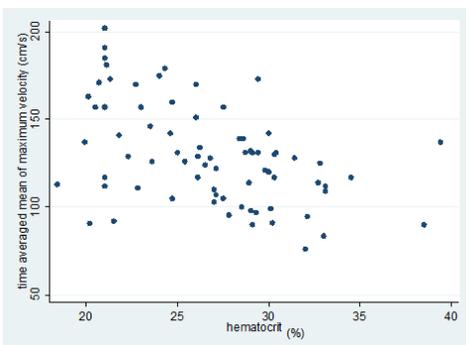


Fig. 3c Correlation between CBFV and hematocrit

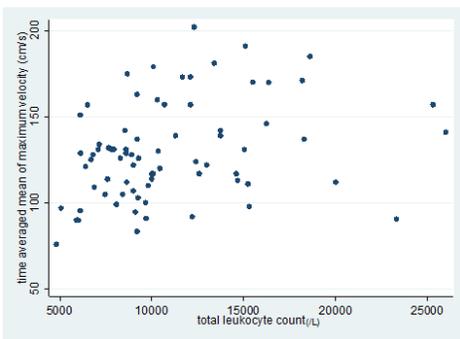


Fig. 3d Correlation between CBFV and total leukocyte count.

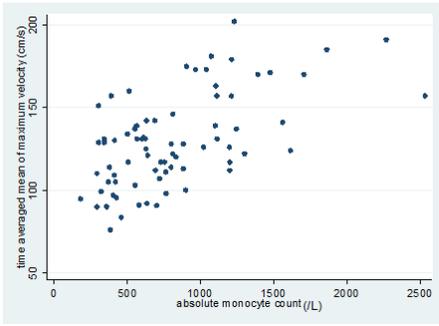


Fig. 3e Correlation between CBFV and absolute monocyte count

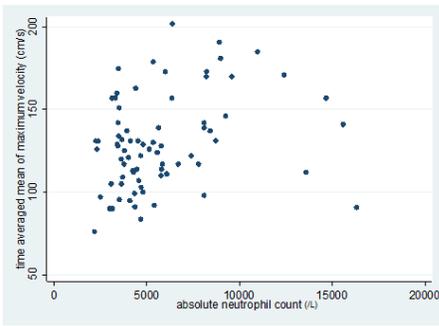


Fig. 3f Correlation between CBFV and absolute neutrophil count

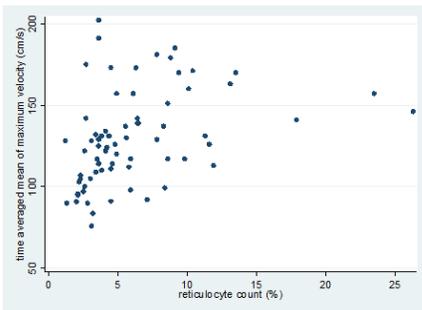


Fig. 3g Correlation between CBFV and reticulocyte count

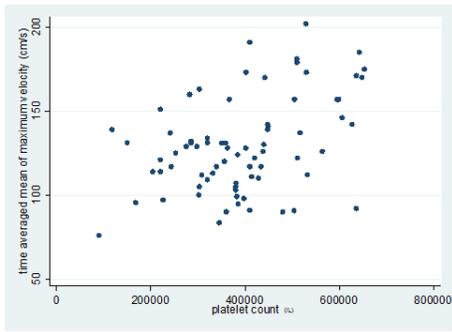


Fig. 3h Correlation between CBFV and Platelet count

## ANEXO II: QUESTIONÁRIO



VELOCIDADE DE FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA FALCIFORME (DF).

### QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. ID: \_\_\_\_\_ 3. Telefone: \_\_\_\_\_ 4. Idade: \_\_\_\_\_
5. Data de Nasc: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 6. Gênero: Masculino (0) \_\_\_\_\_ Feminino (1) \_\_\_\_\_
6. Endereço: \_\_\_\_\_
7. O genótipo: SS ( ) SC ( ) Sβ thal ( ) CC ( ) outros ( )
8. A idade no diagnóstico do DF: \_\_\_\_\_ 9. Data de inscrição no DF clínica: \_\_\_\_\_
10. Clínica inscritos: HUPES ( ) HEMOBA ( ) Outros ( )
11. História de: a. AVC: sim ( ) não ( ) b. Se sim, data do primeiro episódio: \_\_\_\_\_ c. Quantos episódios no último ano \_\_\_\_\_ d. A síndrome torácica aguda/pneumonia: sim ( ) não ( ) e. Se sim, data do primeiro episódio \_\_\_\_\_ f. Quantos episódios no último ano \_\_\_\_\_ g. Dor óssea: sim ( ) não ( ) h. Se sim, quantos do episódos no última ano \_\_\_\_\_ i. Priapismo: sim ( ) não ( ) j. Se sim, data do primeiro episódio \_\_\_\_\_ k. Quantos episódos no último ano \_\_\_\_\_ l. A transfusão de sangue: sim ( ) não ( ) m. Se sim, data da primeira transfusão \_\_\_\_\_ n. Data da última transfusão \_\_\_\_\_ o. quantas das transfusões no último ano \_\_\_\_\_ p. Qualquer história febre, tosse, dor: sim ( ) não ( )
12. Exame clínico: a. Palidez: sim ( ) não ( ) b. Icterícia: ( ) não ( ) c. Peso: (Kg): \_\_\_\_\_ d. Altura (M): \_\_\_\_\_ f. IMC ( Kg/M<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_ g. Spo<sub>2</sub>: \_\_\_\_\_
12. Laboratório: a. Hemoglobina: \_\_\_\_\_ b. Hematócrito: \_\_\_\_\_ c. Lecócitos: \_\_\_\_\_ d. Neutrófilo absoluto: \_\_\_\_\_ e. Retic (%): \_\_\_\_\_ f. hemoglobina fetal (%): \_\_\_\_\_ g. Plaquetas \_\_\_\_\_
13. Medicamentos atuais: \_\_\_\_\_
14. DTC: a. Direita \_\_\_\_\_ b. Esquerda \_\_\_\_\_ c. Resultado: baixa ( ) normal ( ) condicional ( ) abnormal ( ) c. Data de exame: \_\_\_\_\_



UFBA

### ANEXO III: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Termo de consentimento livre e Esclarecido



FIOCRUZ

#### Velocidades de fluxo de sangue cerebral em crianças e adolescentes com doença falciforme (DF).

Durante a leitura do documento abaixo, fui informado de que posso interromper para perguntar a qualquer pergunta para o meu melhor entendimento.

Acordo

Eu,....., foi abordado pelo Doutor Bartholomew Friday Chukwu sobre o projeto de pesquisa com o título acima citado conduzido pelo serviço de hematologia pediátrica UFBA/FIOCRUZ.

Eu, .....de..... anos com doença falciforme sob a minha responsabilidade foi selecionado para participar neste estudo Doppler transcraniano. O referido médico me explicou que informações relacionadas à doença será recolhida a partir de mim a fim de identificar alguns aspectos importantes do curso clínico da doença. Eu também foi informado de que o meu peso, altura e pressão arterial será medido em nenhum risco para mim. O médico também me disse que a minha saturação arterial de oxigênio será medido utilizando uma pequena máquina aposto o meu dedo para alguns minutos e que isto não vai causar nenhum dano a minha saúde. Além disso, explicou para mim que o sangue será recolhida a partir de minha mão para alguns testes e que vou sentir um pouco de dor e pode ter um pouco de inchaço (hematoma) no local de inserção da agulha.

Eu também foi dito que eu tenha permissão a qualquer momento para revogar o meu consentimento e sair do estudo sem sofrer qualquer penalização ou perda de direitos. No entanto, testes adicionais podem ser necessárias se o médico que atende o julgar necessário para a saúde e o bem-estar da criança. A minha recusa de deixar o meu filho ou enfermaria para participar do estudo não irá resultar em sanções ou perda de benefícios aos quais ele/ela pode ter direito.

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Testemunhei a explicação anterior, confirmando a oportunidade concedida à pessoa responsável para fazer perguntas e testemunhar a assinatura da pessoa responsável no presente documento.

Têm dificuldade para ler (sim ou não?), também eu CERTIFICO QUE DR .....

..... Quando LER ESTE DOCUMENTO PAUSADO clarificadas as minhas perguntas e ter o meu consentimento para participar do estudo, EU CONCORDO E COLOCAR O meu dedo polegar IMPRIMIR ABAIXO

Salvador, \_\_\_\_\_ 201\_\_\_\_\_

Nome: ..... Assinatura ou impressão digital \_\_\_\_\_

Testemunhas

1. Nome: ..... Assinatura .....

2. Nome: ..... Assinatura .....

Assinatura do investigador: .....

Se necessário, entre em contato pelo telefone (71) 993716025.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Chukwu, Bartholomew Friday  
C559v Velocidade de fluxo sanguíneo cerebral em crianças e adolescentes com doença  
falciforme em Salvador, Bahia. / Bartholomew Friday Chukwu. - 2017.  
98 fl. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Marilda de Souza Goncalves, Laboratório de  
Hematologia, Genética e Biologia Computacional.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da  
Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2017.

1. Doença Falciforme. 2. Doppler Transcraniano. 3. Crianças. 4.  
Adolescentes. 5. Salvador. I. Título.

CDU 616.155.194

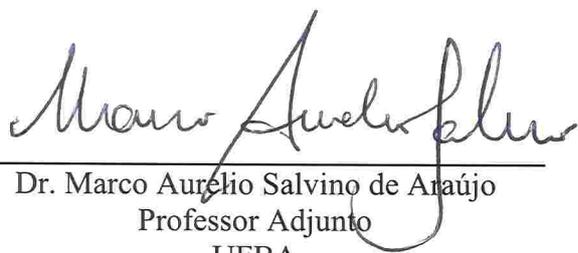
**"VELOCIDADE DE FLUXO SANGUINEO CEREBRAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM  
DOENÇA FALCIFORME EM SALVADOR, BAHIA"**

**BARHOLOMEW FRIDAY CHUKWU**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 16 de agosto de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA



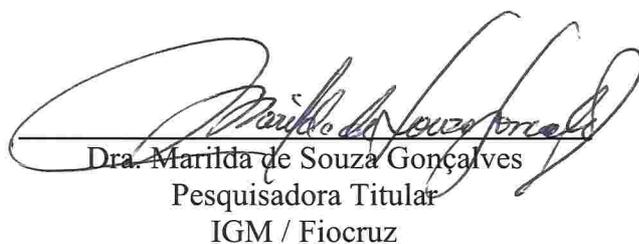
---

Dr. Marco Aurélio Salvinho de Araújo  
Professor Adjunto  
UFBA



---

Dr. Edvan de Queiroz Crusóe  
Medico  
HUPES



---

Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisadora Titular  
IGM / Fiocruz