



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

ROZANA DOS SANTOS TEIXEIRA

**FUNÇÃO ENDOTELIAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS E LABORATORIAIS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador
2016

ROZANA DOS SANTOS TEIXEIRA

**FUNÇÃO ENDOTELIAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS E LABORATORIAIS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marice Teixeira Ladeia

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Terse Ramos

Salvador
2016

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Central da EBMS

T256 Teixeira, Rozana Santos
Função Endotelial e sua associação com manifestações clínicas e laboratoriais em crianças e adolescentes com Anemia Falciforme/ Rozana dos Santos Teixeira. – Salvador. 2015.

100f. il.

Dissertação (mestrado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Marice Ladeia

Co-orientadora: Regina Tere Ramos

Inchi bibliografia

1. Anemia Falciforme. 2. Disfunção Endotelial. 3. Crianças e adolescentes.
4. Vasodilatação mediada por fluxo. I. Título

CDU: 616.155.135

Nome: TEIXEIRA, Rozana Santos

Título: Função endotelial e sua associação com manifestações clínicas e laboratoriais em crianças e adolescentes com anemia falciforme.

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Medicina e Saúde Humana.

Aprovado em 27 de novembro de 2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr (a): Dra. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo

Titulação: Doutora em Cardiologia pela Universidade de São Paulo
Professor Adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof(a). Dr (a): Maria da Glória Bonfim Arruda

Titulação: Doutora em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia
Professora Associada I da Universidade Federal da Bahia , UFBA

Prof(a). Dr (a): Isa Menezes Lyra

Titulação: Doutora em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia
Médica da Universidade Federal da Bahia, UFBA.

Dedico este trabalho aos pacientes e suas famílias, razão do meu exercício na medicina e constante fonte de alimentação de afeto e aprendizado

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é uma forma singular de reconhecimento e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão”.

Alan Vaszatte

Existem pessoas que nos ensinam com seu exemplo de doação e profissionalismo: Dra. Ana Marice Ladeia e Dra. Regina Terse, minhas orientadoras. Eterna gratidão pelos ensinamentos, carinho e dedicação durante todo este trabalho.

Aos meus pais, que adolescentes, aceitaram a tarefa da progenitura e me conduziram com amor incondicional.

A minha avó Bela e meu avô Claudionor *in memoriam*

A Mozart, meu querido companheiro, pela compreensão aos meus anseios e às longas horas debruçadas na confecção deste conhecimento.

Aos meus filhos Ismael, Rafael, Ester e João Victor pela aprovação e orgulho silenciosos aos meus esforços.

Aos netos Joaquim, Davi e Alice, certeza de alegria e refazimento na contemplação de suas presenças.

A Prof. Luís Fernando Adan, e Profa. Luciana Silva pelo incentivo que sempre me deram para que me aperfeiçoasse profissionalmente.

A Valma, pediatra exemplar e amiga querida pela generosa contribuição na captação de pacientes para esta pesquisa.

A Dr. Ney Boasorte por sua sabedoria generosamente compartilhada nos ajustes finais deste trabalho.

A Dr. Luís Cláudio por ter me ajudado a pensar.

À equipe da pesquisa: Dra. Tatiana Ferreira, Dra. Isa Lyra, Dra. Cristina Sales, Dra. Mara Risatto, os acadêmicos Isa Perdiz, Mariana Motta, Mariana Maia, Francianne Ribeiro, Sullivan Miranda, Vinícius Machado serei eternamente grata pela cooperação e parceria.

Aos amigos da Casa do Caminho por compartilharem o ideal do aprimoramento espiritual a cada dia.

Aos meus médicos Dr. Carlos Sampaio e Dra. Mayra, Dinah, equipe da AMO e aos trabalhadores do mundo invisível que trabalharam na restituição da minha saúde física e espiritual.

Ao Dr. Dilton Mendonça pelos conselhos e por sua amizade.

Aos colegas e professores do mestrado, pelos momentos compartilhados e pelo apoio nesta fase da minha vida.

Aos pacientes da pesquisa, representados em fichas de notificação e prontuários, o meu respeito e gratidão.

E foi então que frente à possibilidade da morte, entendi o viver.

Rozana Teixeira

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

EBMSP - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FMB - Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

HEMOBA – Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia

HGRS – Hospital Geral Roberto Santos

FONTE DE FINANCIAMENTO

FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

RESUMO

Introdução: Alterações hematológicas podem agredir as células endoteliais levando à disfunção endotelial precoce na Anemia Falciforme (AF). É provável que exista associação entre disfunção endotelial e as diversas manifestações clínicas da AF. **Objetivos:** Avaliar a presença de alteração da função endotelial em crianças e adolescentes com AF e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais; comparar disfunção endotelial entre falcêmicos em uso e não uso de hidroxiuréia (HDX). **Material e Métodos:** Estudo seccional, analítico com grupo de comparação, envolvendo 40 crianças e adolescentes estáveis com Hemoglobina SS, das quais 18 em uso de hidroxiuréia (HDX) e 25 crianças saudáveis, de 6 a 18 anos de idade. Aplicado questionário estruturado para dados demográficos, exame físico, dosagem de reticulócitos, bilirrubinas, LDH, transaminases, perfil lipídico, glicemia, PCR de alta sensibilidade, hemograma e da saturação periférica da oxihemoglobina. Função endotelial foi avaliada através da vasodilatação mediada por fluxo (VMF) da artéria braquial, utilizando-se método ultrassonográfico com Doppler. Para comparar médias utilizou-se Teste t; para comparar proporções teste de Fischer e teste de *Spearman* para correlações. Realizado Regressão linear para análise multivariada. O percentil 10 da VMF no grupo saudável foi utilizado como valor de corte para definir disfunção endotelial. Os dados foram processados no programa SPSS versão 20. **Resultados:** O grupo HbSS e grupo de comparação apresentaram idade semelhante, $12,3 \pm 3$ anos vs $11,4 \pm 3$ anos, ($p=0,24$). O gênero masculino correspondeu a 60% do grupo HbSS. A média \pm DP da VMF nos pacientes com AF foi inferior a do grupo de comparação ($10,4 \pm 5\%$ vs $18,4 \pm 9\%$; $p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem HDX ($9,9 \pm 6\%$ vs $10,8 \pm 4\%$ $p= 0,56$). Indivíduos HbSS com $VMF \leq 6,3\%$ (percentil 25), apresentaram nº de internamentos por CVO mais elevado ($p =0,020$). Observou-se correlação negativa entre VMF e número de STA no último ano ($r^s = - 0,343$ $p = 0,030$), mas não com demais variáveis clínicas e laboratoriais. **Conclusões:** Crianças e adolescentes com AF apresentam comprometimento da função endotelial sendo que valores de VMF abaixo do percentil 25 provavelmente se associam a manifestações clínicas e laboratoriais. A ausência de diferença entre indivíduos em uso e não de HDX, pode sugerir possível melhora da função endotelial pelo uso da droga.

Palavras chaves: Anemia Falciforme; disfunção endotelial; vasodilatação mediada por fluxo; crianças e adolescentes.

ABSTRACT

Introduction: Hematological changes can damage the endothelial cells leading to an early endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease (SCD). It is possible that there is an association between endothelial dysfunction and several clinical manifestations of SCD. Objectives: To evaluate the presence of changes in endothelial function in children and adolescents with SCA and its association with clinical and laboratory variables, as well as to compare the endothelial function between sickle cell patients using and not using hydroxyurea (HDX). **Methods:** Cross-sectional and analytical study that included 40 children and adolescents with stable hemoglobin SS, of which 18 in use of hydroxyurea (HDX) and 25 healthy children aged 6-18 years. The clinical evaluation included: structured questionnaire for demographics physical examination. Reticulocytes, bilirubin, LDH, transaminases, lipid profile, blood glucose, high-sensitivity CRP, blood count and peripheral oxyhemoglobin saturation were measured. Endothelial function was assessed by flow-mediated vasodilation (FMD) of the brachial artery, using ultrasound Doppler method. To compare means t test was used; Fischer test to compare proportions and Spearman test for correlations. Linear regression was performed for multivariate analysis. The 10th percentile of FMD in the healthy group was used as a cutoff to define endothelial dysfunction. Data were analyzed using SPSS version 20. **Results:** The HbSS group and comparison group had similar age, 12.3 ± 3 years vs 11.4 ± 3 years ($p = 0.24$), with a predominance of males (60%) in HbSS group. FMD in patients with SCD was lower than the comparison group (10.4 vs. $18.4 \pm 5\% \pm 9\%$, $p = 0.001$). There was no statistically significant difference between groups in use and not use of HDX ($9.9 \pm 6\%$ vs $10.8 \pm 4\%$, $p = 0.56$). HbSS individuals with $FMD \leq 6.3\%$ (25th percentile) had a higher number of admissions for vaso-occlusive events ($p = 0.020$). There was a negative correlation between FMD and number episodes of acute chest syndrome in the last year ($r^s = -0.343$ $p = 0.030$) but not with other clinical and laboratory variables. **Conclusions:** Children and adolescents with SCD have impaired endothelial function, and FMD values below the 25th percentile probably associate with clinical and laboratory manifestations. The lack of difference between individuals using and not using HDX can suggest possible improvement in endothelial function by drug use.

Key Words: Sickle Cell Anemia; endothelial dysfunction; Flow-mediated vasodilatation; children and adolescents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Incidência da Doença Falciforme no Brasil	16
Figura 2 - Modelo esquemático do processo de oclusão vascular na Doença Falciforme	17
Figura 3 - Estrutura da hemoglobina normal.....	22
Figura 4 –Representação dos diferentes tipos de hemoglobina de acordo com o período de produção e cadeia globínica	23
Figura 5 –Eletroforese da hemoglobina.....	24
Figura 6 –Fisiopatologia da vasclusão e da disfunção endotelial.....	29
Figura 7 - Representação do mecanismo de disfunção endotelial e vasoclusão e subfenótipos hemolítico e vasoclusivo	30
Figura 8 - Mecanismo de ação da Hidroxiuréia.....	36
Figura 9 - Gênese da vasodilatação mediada por fluxo	37
Figura 10 –Determinação do fluxo da artéria braquial no estado basal através do Doppler pulsado.....	47
Figura 11-Diâmetro Determinação do Fluxo da artéria braquial através do Doppler pulsado no período de hiperemia reativa.....	48
Figura 12. Diâmetro da artéria braquial através de ultrassonografia de alta resolução no estado basal.....	48
Figura13. Diâmetro da artéria braquial através de ultrassonografia de alta resolução no período de hiperemia reativa.....	49
Figura 14. Dilatação mediada por fluxo (%) = (diâmetro B - diâmetro A / diâmetro A) x 100.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

Tabela 1 – Principais alterações moleculares da hemácia em consequência do fenômeno de falcização	27
Tabela 2 - Características sociodemográficas e clínicas dos grupos HbSS e grupo comparação em Salvador-BA, entre junho de 2014 a março 2015	54
Tabela 3 – Características dos grupos sem hidroxuréia (HDX) e com HDX.....	55
Tabela 4 – Características laboratoriais dos grupos sem HDX e com HDX	56
Tabela 5 – Frequência das manifestações clínicas entre indivíduos HbSS até o momento da inclusão no estudo.....	56
Tabela 6 – Comparação das variáveis clínicas e laboratoriais entre indivíduos HbSS segundo a presença ou não de disfunção endotelial	59
Tabela 7 – Comparação das variáveis clínicas e laboratoriais entre indivíduos HbSS segundo a presença de VMF < 6,3% e ≥ 6,3%.....	60
Tabela 8 – Correlações entre VMF e variáveis clínicas e laboratoriais envolvendo 40 indivíduos com anemia falciforme.....	61
Tabela 9 – Análise de regressão linear para verificar fatores independentemente correlacionados à vasodilatação mediada por fluxo.....	62

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação entre as médias da VMF dos grupos HbSS e grupo comparação.....	57
Gráfico 2 – Comparação da VMF entre os grupos sem HDX e com HDX	58
Gráfico 3 – Correlação entre VMF e número de episódios de STA no último ano.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Anos
AF	Anemia Falciforme
AVE	Acidente vascular encefálico
CVO	Crise vasclusiva
CAR	Republica Central Africana
CT	Colesterol total
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
G-CSF	Fator estimulador de colônia granulocítica
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade colesterol
HDX	Hidroxiuréia ou Hidroxicarbamida
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia
HGRS	Hospital Geral Roberto Santos
ICAM – 1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade -colesterol
NO	Óxido Nítrico
PCR as	Proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade
SpO2	Saturação periférica da oxihemoglobina
STA	Síndrome torácica aguda
TG	Triglicérides
VMF	Vasodilatação mediada por fluxo
VCAM – 1	Molécula de adesão celular vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 Primário	20
2.2 Secundário	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Dados da História	21
3.2 A Hemoglobina normal	22
3.3 Métodos de análise da hemoglobina	23
3.4 A Hemoglobina S	24
3.5 O Fenômeno da Polimerização da HbS	25
3.6 Ativação Endotelial e Inflamação	27
3.7 Disfunção Endotelial	29
3.8 Manifestações Clínicas	31
3.8.1 Anemia	31
3.8.2 Sequestro esplênico	31
3.8.3 Episódios Dolorosos	32
3.8.4 Síndrome Torácica Aguda	32
3.8.5 Complicações Neurológicas	33
3.8.6 Hipertensão pulmonar	34
3.8.7 Priapismo	35
3.9 A Hidroxicarbamida	35
3.10 Avaliação da Função Endotelial através da VMF	36
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
4.1 Delineamento do estudo	39
4.2 Período do Estudo	39
4.3 População Alvo	39
4.4 População Acessível	39
4.5 Amostra	40
4.5.1 Técnica de Amostragem	40
4.5.2 Cálculo do tamanho amostral	40

4.6 Critérios de elegibilidade	40
4.6.1 Critérios de inclusão	40
4.6.1.1 Grupo HbSS	40
4.6.1.2 Grupo sem HbSS	40
4.6.2 Critérios de exclusão	41
4.6.2.1 Grupo HbSS	41
4.6.2.2 Grupo sem HbSS	41
4.7 Definição e Operacionalização das Variáveis	41
4.7.1 Variáveis Dependentes.....	41
4.7.2 Variáveis Independentes	42
4.7.2.1 Variáveis clínicas e sóciodemográficas	42
4.7.2.2 Variáveis laboratoriais	42
4.7.3 Definição de eventos clínicos	42
4.7.4 Definição de critérios de gravidade.....	43
4.7.5 Definição de critérios de dislipidemia.....	44
4.8 Protocolo Coleta de Dados	44
4.8.1 Avaliação clínica através de questionário estruturado	44
4.8.2 Exame físico	44
4.8.2.1 Peso	44
4.8.2.2 Altura	45
4.8.2.3 IMC.....	45
4.8.2.4 Medida da pressão arterial (PA).....	45
4.8.2.5 Oximetria de pulso.....	46
4.8.3 Avaliação da função endotelial	46
4.8.4 Coleta de sangue	49
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5.1 Hipótese nula	51
5.2 Hipóteses alternativas	51
5.3 Estatística Descritiva	51
5.4. Análise Bivariada e Multivariada	52
5.5 Aspectos Éticos	52
6. RESULTADOS	53
7. DISCUSSÃO	63
8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	67

9 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme (AF) faz parte de um grupo de hemoglobinopatias hereditárias, conhecida como Doença Falciforme ou Síndrome Falciforme, que apresenta grande importância em vista da ampla distribuição geográfica, manifestações clínicas variadas, impacto na qualidade de vida e gastos com a saúde pública. A troca do ácido glutâmico pela valina na cadeia beta da globina determina a formação de uma hemoglobina anormal (Hb S) com propriedades físico-químicas diferentes da Hb normal (HbA). O termo doença falciforme define as hemoglobinopatias nas quais, pelo menos, uma das hemoglobinas mutantes é a Hb S. As doenças falciformes mais frequentes são a **anemia falciforme (ou Hb SS)**, a **S talassemia** e as duplas heterozigoses **Hb SC** e **Hb SD**.¹

A maior prevalência da AF ocorre na África tropical e entre os negros de países que participaram do tráfico de escravos (Wang WC – 1999).² No Brasil dados do Plano Nacional de Triagem 2013 demonstram que nascem aproximadamente 1000 recém - nascidos com Doença Falciforme / ano e incidência de 1: 2700 RN nascidos vivos/ano (**Figura 1**). Apresenta prevalência mais alta nos estados com maior concentração de afro descendentes que ocupam os seguimentos sociais mais vulneráveis (IBGE e Secretaria de Vigilância em Saúde do MS). Das crianças não cuidadas, 80% não alcançam cinco anos de vida.³ A elevada letalidade abrangendo especialmente jovens reflete a gravidade da doença. O único tratamento medicamentoso até o momento disponível é a hidroxiuréia (HDX).



Figura 1. Incidência da Doença Falciforme no Brasil

Fonte: Ministério da Saúde³ – 2014

Por muitos anos a patogênese da AF foi atribuída predominantemente à polimerização da desoxi-HbS. Alterações na morfologia, associadas a alterações na função do eritrócito e da hemoglobina levando ao fenômeno da vasclusão. A rápida expansão das pesquisas em torno da vasculopatia na AF revelou que as manifestações agudas e crônicas desta doença, resultam de um complexo mecanismo multifatorial envolvendo o endotélio. A interação da célula falciforme ao endotélio é o gatilho para a ativação de leucócitos, plaquetas e células endoteliais, que passam a expressar moléculas de adesão de superfície endotelial, tais como a VCAM-1, ICAM-1, e molécula de adesão de leucócitos endoteliais (ELAM ou E-selectina), induzidas por citocinas pró-inflamatórias.^{4, 5} O estado de ativação endotelial observado nestes pacientes parece ser fator contribuinte da formação de agregados heterocelulares aderidos à parede do vaso e oclusão vascular.^{6, 7, 8}

Figura 2

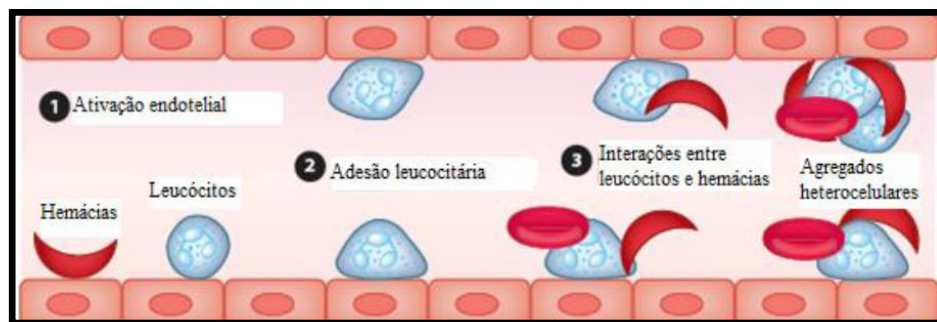


Figura 2. Modelo esquemático do processo de oclusão vascular na Doença Falciforme. Adaptado de Kassim e DeBaun⁹, 2013.

Existem evidências que a hemólise também contribua para a vasculopatia observada na AF. Estudos realizados em adultos com complicações vasculares da doença demonstraram associação com níveis mais baixos de hemoglobina e níveis mais elevados de marcadores de hemólise. A lise da hemácia em foice libera hemoglobina livre no plasma^{10, 11} convertendo o óxido nítrico (NO) em nitrato inativo. Ocorre também liberação de arginase que consome L-arginina, substrato necessário à produção de NO.^{12, 13}

O óxido nítrico é o principal fator de relaxamento derivado do endotélio, responsável pela manutenção do tônus vascular e reatividade.¹⁴ Antagoniza as ações de potentes vasoconstrictores derivados do endotélio, como a angiotensina II e a endotelina-1, inibe a ativação de plaquetas e de glóbulos brancos e mantém o músculo liso vascular em um estado não proliferativo.¹⁵

Disfunção endotelial é caracterizada por uma resposta vasodilatadora endotélio-dependente deficiente, que favorece a agregação plaquetária, adesão de glóbulos brancos e proliferação de células do músculo liso.¹⁶ Em pacientes com função endotelial saudável, estímulos dependentes do endotélio como, fluxo sanguíneo ou acetilcolina incitam vasodilatação por aumentar a liberação de NO. Em pacientes com função endotelial comprometida ocorre significativa diminuição ou resposta paradoxal aos estímulos dependentes do endotélio.¹⁵ Em indivíduos com fatores de risco para doença coronariana ou com aterosclerose estabelecida existem evidências que esta resposta melhora com a terapia específica, consequentemente a função endotelial é um excelente barômetro da saúde vascular.¹⁷

Ultrassom da artéria braquial é uma técnica não invasiva, amplamente utilizada para medida da função endotelial.^{18, 19} O fluxo sanguíneo no antebraço é ocluído por 5 minutos, utilizando um manguito de pressão arterial mantendo uma pressão de 250 mmHg. Quando a pressão é liberada, ocorre hiperemia reativa. Esta técnica tem a vantagem de não ser invasiva e facilmente identificar populações com função endotelial atenuada, além disto, produz resultados precisos e reprodutíveis.^{16, 20}

As principais limitações desta técnica são a necessidade de experiência ultrassonográfica e uma significativa variabilidade dia-a-dia (cerca de 25%), devido a ritmos circadianos biológicos. No entanto, atualmente, esta abordagem é amplamente utilizada para avaliar a função vasomotora.¹⁶ Foi descrita pela primeira vez para uso em crianças por Celermajer *et al* em 1992.²¹ Montalembert M *et al*²² utilizaram este método em 22 crianças com Doença Falciforme (DF), com faixa etária de 7 a 13 anos de idade, comparada a 28 indivíduos Afro-caribenhos AA e AS pareados por idade e sexo, demonstrando decréscimo da resposta de dilatação da artéria braquial nas crianças com DF sendo $p = 0,008$. Zavar *et al*²³ e Belhassen *et al*²⁴ também utilizaram esta técnica em adultos jovens (média de idade 23 e 28 anos respectivamente) com doença falciforme demonstrando capacidade de vasodilatação endotélio dependente reduzida ($p < 0,005$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Foi demonstrado em pacientes com aterosclerose que disfunção endotelial pode ocorrer muito antes das manifestações estruturais e assim, pode servir como um preditor independente de eventos cardiovasculares futuros.¹⁵

A AF apresenta quadro clínico heterogêneo, com gravidade variável. Alguns fatores de risco para complicações específicas da doença são conhecidos, porém prever a gravidade global da doença ainda não foi possível. Identificar novos fatores moduladores continua sendo importante para compreensão dos subfenótipos desta doença. O **haplótipo** CAR (República Central Africana) apresenta forma mais grave e o Benin quadros mais moderados. Os **genótipos** HbSS, HbS/beta^o talassemia apresentam maior gravidade de doença que compostos do tipo HbS/HbC, HbS/HbD e Sβ+-talassemia. Associação com α-talassemia reduz a concentração de HbS diminuindo a falcização.²⁵ A **hemoglobina fetal** (HbF), modulador da AF mais estudado, atua inibindo a polimerização da HbS.²⁶

Contagem leucocitária elevada no paciente sem crises (*steady state*) é considerada fator independente de risco para morte precoce e está associada a várias complicações da AF, tais como: AVC, infarto cerebral silencioso, síndrome torácica aguda e priapismo.^{6, 27, 28} Também está significativamente associada ao desenvolvimento de nefropatia da AF.²⁸

Em crianças com HbSS **níveis elevados de desidrogenase láctica** se correlacionaram significativamente com hemoglobina, reticulócitos, aspartato transaminase e alterações no fluxo sanguíneo da artéria cerebral média avaliadas através do doppler transcraniano.²⁹

Elevação dos níveis séricos de desidrogenase láctica, elevação de bilirrubina e diminuição da Hb se relacionaram a maior prevalência e maior severidade de hipertensão pulmonar.^{12,30} **Episódios recorrentes de dor associam-se** à mortalidade precoce em maiores de 20 anos de idade.³¹ Os episódios de dor aguda tendem a serem mais frequentes em pacientes com HbSS, hematócrito alto, baixa concentração de hemoglobina fetal³¹, história de sibilância por asma³² e hipoxemia noturna.³³

Avaliação da função endotelial em crianças e adolescentes com AF através da VMF tem sido pouco realizada e é inédito em nosso meio. Esta investigação através de uma ferramenta não invasiva, reprodutível e menos dispendiosa pode ser útil para futuramente estratificar riscos de complicações vasculares, testar resposta terapêutica e estabelecer prognóstico. Identificar a associação entre disfunção endotelial e manifestações clínicas e laboratoriais poderá auxiliar no planejamento de estratégias mais rigorosas no acompanhamento desses pacientes bem como permitir sua utilização no acompanhamento de pacientes em uso de HDX.

2. OBJETIVOS

2.1 Primários

- Testar a hipótese de que crianças e adolescentes com anemia falciforme apresentam alteração da função endotelial quando comparadas a um grupo de crianças e adolescentes saudáveis, sem hemoglobinopatia.
- Avaliar a associação entre disfunção endotelial e variáveis clínicas e laboratoriais na AF.

2.2 Secundário

- Comparar a função endotelial entre pacientes falcêmicos em uso e não uso de hidroxiuréia (HDX).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Dados da História

A anemia falciforme foi registrada pela primeira vez em 1910, por James B. Herrick, médico cardiologista de Chicago – EUA, em um estudante de odontologia de 20 anos de idade, natural de Granada/ Antilhas, região da Índia Ocidental. Apresentava anemia, icterícia recorrente, febre e ulcerações em membros inferiores, associado a eritrócitos alongados, em forma de foice no esfregaço do sangue periférico.³⁴ Há relatos que Africanus Horton, também conhecido com James Beale tenha descrito manifestações clínicas desta doença pela primeira vez em 1874, em indivíduos africanos que apresentavam episódios dolorosos característicos desencadeados pelo frio ou pelo calor.^{28 35} Africanus Horton era médico cirurgião, cientista, soldado, pensador político, que lutou pela independência da África um século antes que este fato histórico ocorresse. Manifestações clínicas da AF já eram conhecidas séculos atrás na África Ocidental, onde os indivíduos com sintomas típicos da doença eram tatuados para identificá-los como portadores de um mal desconhecido.³⁶ No Brasil a primeira referência a um paciente com AF foi feita por Álvaro Serra de Castro em 1933 em Sessão da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro.³⁷

Pauling e colaboradores em 1949³⁸ cunharam o termo “doença molecular” e inauguram a era do conhecimento molecular da Anemia Falciforme (AF) ao submeter soluções de hemoglobina de paciente com AF à eletroforese, observando uma hemoglobina anormal, com migração muito mais lenta que a hemoglobina A. Esta proteína anormal foi designada de HbS ou hemoglobina falciforme.

As principais descobertas relacionadas à fisiopatologia desta doença estão enumeradas abaixo por ordem cronológica:³⁹

1924: Associação da hemólise da hemácia em foice às manifestações de anemia, icterícia e colelitíase.

1924: Associação da vasclusão à isquemia e dano tecidual
1948: Mobilidade eletroforética da HbS

1948: Identificação do valor benéfico das altas concentrações da Hb fetal

1951: Caracterização da polimerização da desoxi-hemoglobina S

1955: Identificação da hidroxycarbamida como modificador de gravidade da doença

1980: Benefício do uso profilático da penicilina em pacientes jovens com AF na redução da mortalidade

1984: Transplante de medula óssea em criança com Anemia Falciforme e leucemia e identificação do potencial de cura deste procedimento

1998: Redução da incidência de acidente vascular encefálico em crianças com Doppler transcraniano alterado quando submetidas a transfusões sanguíneas regulares.

3.2 A Hemoglobina normal

A Hemoglobina é a maior molécula em adultos, uma proteína com peso molecular de 64.500 dáltons que se constitui no principal componente do eritrócito. Cada hemácia contém em seu interior aproximadamente 280 milhões de moléculas de hemoglobina. É solúvel na água e formada pela união de uma proteína incolor: a globina, que por sua vez é constituída de dois pares de cadeias de aminoácidos, alfa (α) e não alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ e épsilon- ϵ) e de um composto prostético heme, corado, que possui quatro grupos. Estes grupos são formados pela protoporfirina IX e uma molécula de ferro, que detém a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o oxigênio nos tecidos. ^{40, 41} **Figura 3**

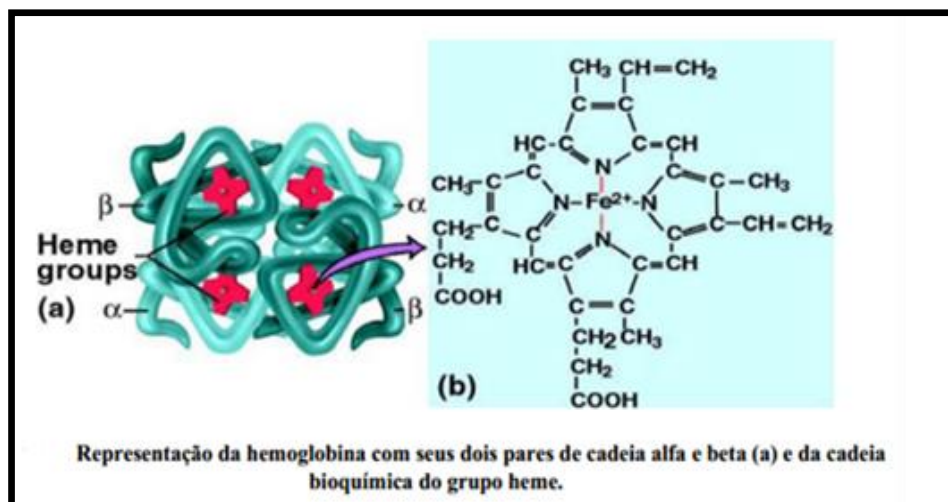


Figura 3. Estrutura da Hemoglobina normal

Fonte: GARNIER *et al*, 2002. ⁴¹

As cadeias alfa são constituídas por 141 aminoácidos e as cadeias não alfa, 146. As combinações entre estas cadeias dão origem às diferentes hemoglobinas que se substituem durante o desenvolvimento do período embrionário (intrauterino) até a fase adulta. ⁴² **Figura 4**

Tipo de hemoglobina	Período preponderante de síntese	Cadeias globínicas
Gower-1	Embrião/até 3º mês de gestação	$\xi_2\varepsilon_2$
Portland	Embrião/até 3º mês de gestação	$\xi_2\gamma_2$
Gower-2	Embrião/até 3º mês de gestação	$\alpha_2\varepsilon_2$
Hb Fetal	Feto/até 6º mês de vida	$\alpha_2\gamma_2$
HbA ₂	Feto/vida adulta	$\alpha_2\delta_2$
HbA	Vida adulta	$\alpha_2\beta_2$

Figura 4. Representação dos diferentes tipos de hemoglobina de acordo com seu período de produção e composição da cadeia globínica
Adaptado de GALIZA NETO 2003 ⁴⁰

A Hb A é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias beta globina ($\alpha_2\beta_2$), a Hb A₂ $\alpha_2\delta_2$ e a Hb F $\alpha_2\gamma_2$, codificadas por diferentes genes. A hemoglobina A está presente nos eritrócitos após os seis meses iniciais de vida e permanece por toda a fase adulta. É a hemoglobina predominante.

3.3 Métodos de análise da hemoglobina

As características químicas diferentes das hemoglobinas permitem que possam ser identificadas através da técnica de eletroforese em acetato de celulose ou agarose, utilizando-se pH alcalino (8 a 9). Esta técnica permite a identificação de hemoglobina normal e variantes através da migração sob a ação de um campo elétrico **Figura 5.**

As hemoglobinas D e S apresentam o mesmo perfil de migração. Para diferenciá-las, a eletroforese de Hb em meio ácido (6,0) está indicada. Nesta situação a HbD se separa da HbS e migra junto com a Hb A confirmando a heterozigose SD. A cromatografia líquida de alta resolução HPLC permite também esta diferenciação. Este método é ainda utilizado para a quantificação da HbF. Na corrida eletroforética em meio alcalino a hemoglobina fetal localiza-se logo abaixo da HbA1, tomando aspecto difuso, o que dificulta a quantificação.

A distribuição proporcional das diferentes hemoglobinas nas hemácias do indivíduo, a partir de seis meses de vida ficam assim definidas: HbA = 96%-98%; HbA2 = 2,5%-3%; e HbF = 0%-1%.⁴³

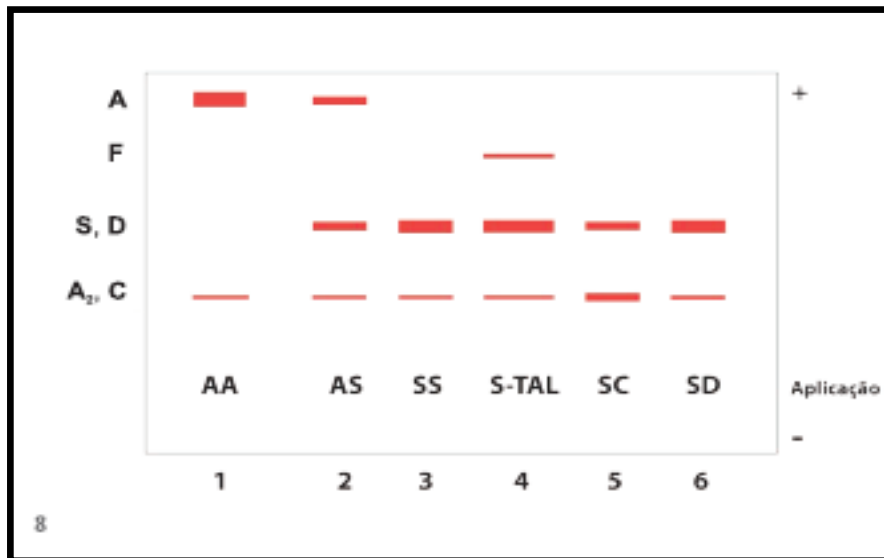


Figura 5. Eletroforese da hemoglobina

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE. - Manual de Conduas Básicas Na Doença Falciforme⁴⁴

3.4 A Hemoglobina S

A hemoglobina S surgiu há cerca de 50 a 100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico.⁴⁰ O fato que motivou a mutação do gene da hemoglobina normal (HbA) para o gene da hemoglobina S (HbS) ainda permanece desconhecido, porém a proteção que conferiu para os portadores AS, em relação à Malária, provavelmente contribuiu para sua perpetuação.

A mutação que deu origem a HbS ocorreu em quatro regiões distintas da África, (Camarão, Bantu, Senegal e Benin, na República Africana Central) mas também é encontrado em Ibadan, Algeria, Sicília, Turquia, Grécia, Iêmen, e

sudoeste da Arábia Saudita. ⁴⁵ O tráfico de escravos durante os séculos XVII e XVIII, provenientes, sobretudo da África Ocidental, permitiu a disseminação do gene falciforme nos Estados Unidos (8% da população negra) e na América Latina, sobretudo Brasil, Cuba, Porto Rico e Panamá.

A substituição pontual da base nitrogenada adenina por timina (GAG → GTG), no sexto códon do éxon 1 no DNA do cromossomo 11, codifica a troca do ácido glutâmico (carga elétrica negativa) pela valina (carga neutra) na posição 6 da sequência de aminoácidos da cadeia beta globina, determinando uma hemoglobina patológica ⁴⁰ a hemoglobina S (derivada da palavra inglesa *sickle*, que em português traduz-se como foice). A hemoglobina mutante possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal, devido à perda de duas cargas elétricas após substituição do ácido glutâmico pela valina.

3.5 O Fenômeno da Polimerização da HbS

Os esforços para elucidar a fisiopatologia da doença falciforme na década de 1980 culminou com uma descrição detalhada da cinética de gelificação,

No estado de oxihemoglobina, a HbS é normal, mas no estado desoxigenado, a molécula de HbS torna-se esticada e as globinas beta S ficam mais próximas. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxihemoglobina envolvendo a valina e receptores fenilalanina (®-85) e leucina (®-88). ⁴⁶ Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS formam um número considerável de moléculas agregadas que geram longos polímeros, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de foice.

O fenômeno da falcização não é instantâneo, mas ocorre após um retardo, com um núcleo inicial, seguido de extensão rápida, de forma que se a hemoglobina voltar a se oxigenar, a falcização não ocorre. Se o tempo de trânsito a partir da extremidade venosa do leito capilar para o lado arterial for mais curto do que o tempo de atraso de gelificação, a polimerização e a oclusão vascular pode ser evitada. Para que as moléculas de HbS se agreguem é necessário que, além de desoxigenadas, estejam em elevada concentração, normalmente acima de 30%, o que facilita sua associação. A circulação mais lenta em alguns órgãos, sobretudo no baço, facilita a falcização, provocando repetidos enfartos que levam à fibrose e

destruição do órgão na maioria dos pacientes (auto-esplenectomia).⁴⁷ A falcização determina um conjunto de alterações moleculares na hemácia que serão responsáveis pelos fenômenos clínicos relacionados à presença da HbS em estado de homozigose. **Tabela 1**

A polimerização impede o uso do oxigênio pela Hb. O oxigênio livre forma bi radicais estáveis (O₂) que são ativados através da incorporação de elétrons a sua estrutura, formando espécies ativadas de oxigênio, os radicais superóxido (H₂O₂). Estes radicais destroem ácidos graxos da membrana do eritrócito provocando lesões e oxidam a HbS, transformando-a em metemoglobina (metaHbS). Aglomerados de metaHbS formam os Corpúsculos de Heinz que, ao se precipitarem ao longo da membrana, alteram a disposição da proteína banda três e expõem a fosfatidilserina. A fosfatidilserina (PS) é uma molécula de adesão presente em maior quantidade na parte interna da membrana celular dos eritrócitos normais, mas em uma parcela dos eritrócitos falciformes essa proporção se inverte. Estudos já comprovaram que eritrócitos com maior exposição dessa molécula possuem potencial de adesão celular três vezes maiores que eritrócitos normais.⁴⁷ Alguns trabalhos correlacionaram exposição de PS nos eritrócitos à geração de trombina, substância necessária para formação de coágulos de fibrina, confirmando a importância da exposição da PS como um dos principais determinantes de aderência celular e da ativação da cascata da coagulação na crise vaso-oclusiva⁴⁸. A ativação excessiva do canal de transporte dos íons potássio e cloro (K⁺Cl⁻) e o aumento da concentração dos íons cálcio (Ca⁺⁺) através da ativação dos canais de Gordon (4) levam a perdas de íons potássio (K⁺) e de água, desidratação celular, adensamento e aumento da CHCM da hemácia. O incremento da concentração de HbS intracelular, resulta no aumento da viscosidade no citosol, polimerização da HbS e rigidez da membrana. Estes fatores, associados a uma maior adesão do eritrócito falcizado ao endotélio favorecem a formação de trombos na micro e na macrocirculação.⁴⁹ Este é o mecanismo das crises vasoclusivas, manifestações agudas, dolorosas, mais frequentes na AF.⁵⁰

Tabela 1 – Principais alterações moleculares das hemácias em consequência do fenômeno de falcização

Principais alterações moleculares das hemácias em consequência do fenômeno de falcização
Aumento do Ca ⁺⁺ intracelular e de membrana
Perda de íons monovalentes, especialmente K ⁺
Perda de água (desidratação celular)
Aumento da densidade dos eritrócitos
Redução da deformabilidade, fragilidade e vesiculação dos eritrócitos
Oxidação da Hb: formação de metemoglobina e superóxidos
Desnaturação da Hb: formação de hemicromos, heme livre e ferro livre
Anomalias das proteínas de membrana: anquirina, banda 3, espectrina
Exposição de fosfatidil-serina na membrana celular
Aumento da adesão ao endotélio mediada por moléculas plasmáticas, da membrana e do endotélio (vide quadro 3)

Tabela 1. Zago et al – 2007 ⁴⁷

3.6 Ativação Endotelial e Inflamação

Durante muitos anos a base da fisiopatologia da AF foi atribuída à polimerização da desoxihemoglobina S, com formações de cristais que obstruem vasos da microcirculação, produzindo isquemia e lesão de isquemia-reperfusão. Posteriormente características específicas do eritrócito falciforme, como expressão de maior número de moléculas de adesão demonstraram que a adesão participa ativamente da obstrução e desencadeamento de fenômenos inflamatórios. ⁴⁷

Existem evidências de que o endotélio vascular está anormalmente ativado na AF através da dosagem de partículas endoteliais no soro de pacientes com AF. As células endoteliais ativadas expressam moléculas como VCAM-1 (*vascular-cell adhesion molecule 1*) e ICAM- 1 (*intercellular adhesion molecule 1*). ⁵¹ Neutrófilos ativados expressam moléculas de adesão leucócito-endotélio (L-selectinas) e leucócito-plaquetas (P-selectinas), que além de favorecer a adesão ao endotélio, recrutam plaquetas e neutrófilos para o sítio de inflamação e produzem H₂O₂ agressor do endotélio vascular. ²⁸ A P-selectina também aumenta a afinidade de

outros receptores ao fator de Von Willebrand e ao fibrinogênio favorecedores de um estado procoagulante celular endotelial.

O endotélio lesado expõe fator tecidual, que desencadeia a cascata da coagulação e libera multímeros de Von Willebrand, num complexo processo de retroalimentação de polimerização da HbS, ativação da coagulação, fenômenos inflamatórios, e alteração do tônus vascular.

Além de produzir NO, as células endoteliais liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias. Durante quadros inflamatórios agudos, como síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), coagulação intravascular disseminada e sepse, os níveis plasmáticos de endotelina-1 estão elevados, assim como nos pacientes com doença falciforme. Esse peptídeo aumenta as concentrações de **VCAM-1 e ICAM-1** solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como **IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GC-SF** e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos.

Pesquisas realizadas por vários autores têm demonstrado elevação de produtos diretos das células endoteliais que sofrem mudanças quando o endotélio está ativado, tais como medidas da biologia do NO, citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, reguladores de trombose, assim como marcadores de dano ou reparo endotelial. Muitos desses marcadores circulantes são de medição difícil e de alto custo e são habitualmente apenas utilizados em ambiente de pesquisa clínica.⁵²

A **figura 6** representa os mecanismos envolvidos na oclusão vascular a partir da polimerização da desoxihemoglobina e ativação endotelial

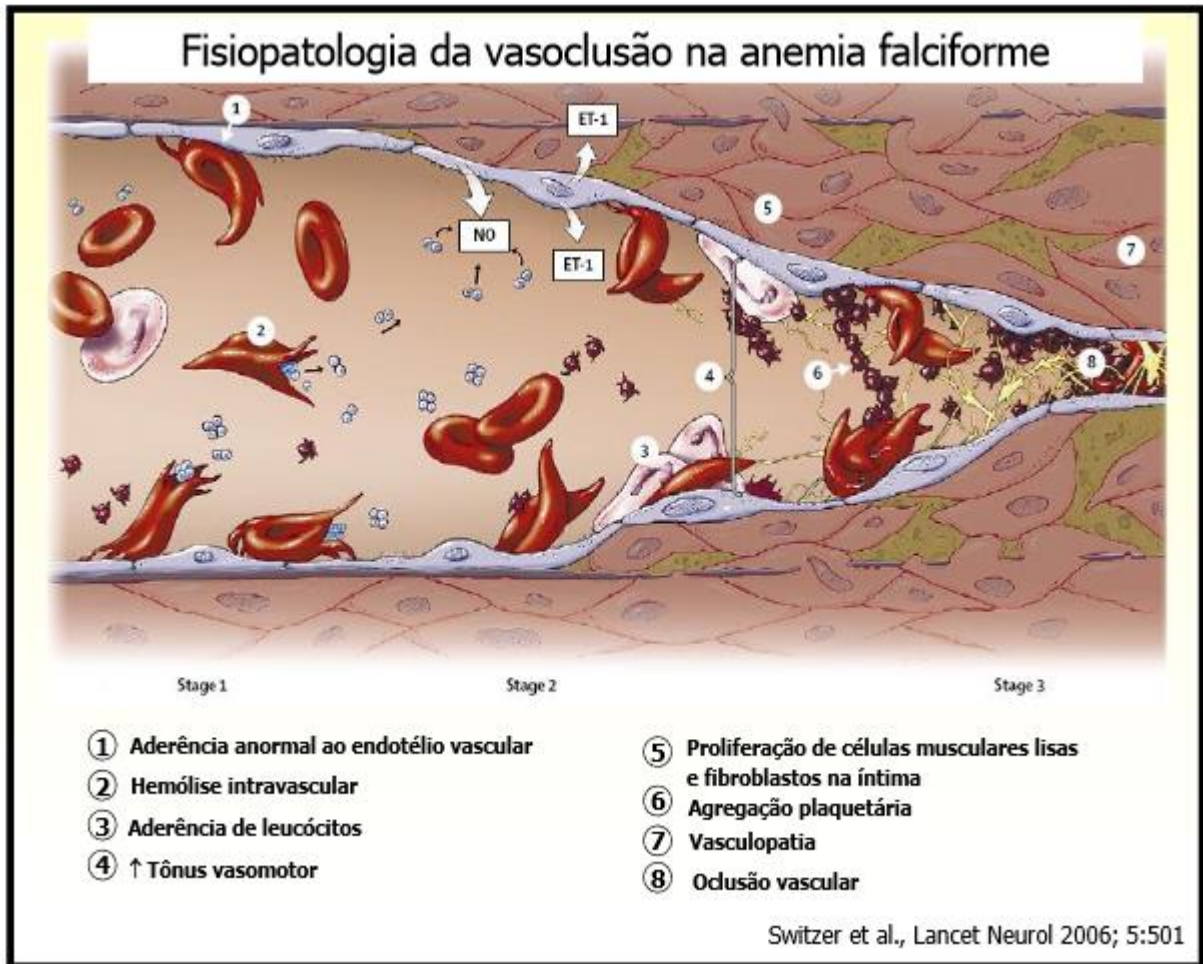


Figura 6 Fisiopatologia da vasocclusão

3.7 Disfunção Endotelial

A hemácia normal vive em torno de 120 dias. A hemácia falciforme vive 10 a 20 dias, sendo retirada da circulação através de hemólise intra e extravascular. Uma consequência da anemia hemolítica é a desregulação da homeostase do óxido nítrico (NO). Entre os mediadores do endotélio, o NO tem um papel central no controle do tônus vascular.⁵³ Além do efeito vasoconstrictor a depleção de NO estimula a ativação de plaquetas, expressão das moléculas de adesão, formação de trombina, proliferação da íntima do endotélio, culminando em estenose e obstrução, base da vasculopatia crônica.^{54 55} A taxa de hemólise tem sido uma medida crítica de gravidade da Doença Falciforme e pode ser a causa de algumas das

complicações observadas nesta enfermidade. ¹³ A hemólise crônica intravascular das hemácias falciformes libera hemoglobina livre e arginase. A arginase utiliza o substrato arginina, para a produção de ornitina, poliaminas e prolina, que promovem a proliferação de músculo liso e a síntese de colágeno, resultando em estenose vascular. A arginina é o precursor normal da produção de NO que em presença da NO endotelial sintetase é convertida em citrulina e a seguir em NO. A hemoglobina livre consome NO, produzindo metemoglobina e nitratos inativos. A depleção do substrato arginina e o sequestro de NO causam redução local desta substância e vasoconstrição. O fenômeno de vasoconstrição retarda o fluxo sanguíneo e retroalimenta a polimerização das hemácias falciformes.

A superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido, por via enzimática (xantina oxidase, NADPH oxidase, eNOS desacoplado) e não enzimática promove estresse oxidativo intravascular que pode perturbar a homeostase do NO. ⁵⁶

A disfunção endotelial, caracterizada pela redução da biodisponibilidade do NO endotelial, é uma característica mecanicista central da doença arterial coronariana e seus fatores de risco, incluindo diabetes, hipertensão, tabagismo e obesidade. ⁵⁷ Este mecanismo tem sido pesquisado nas ultimas décadas na Doença Falciforme e relacionado a um subfenótipo hemolítico, que se caracteriza por maior ocorrência de AVE, STA, priapismo e úlceras em pernas. Gladwin observou correlação de aumento de taxas de hemólise em adultos com AF, hipertensão pulmonar e maior mortalidade. ¹² **Figura 7**

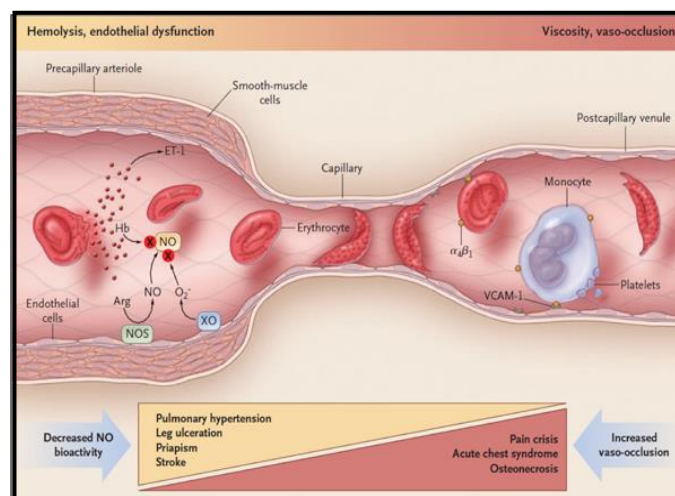


Figura 7. Representação do mecanismo de disfunção endotelial e vasoconstrição e subfenótipos hemolítico e vasooclusivo

Fonte: Gladwin e Vichinsky 2008. ⁵⁸

3.8 Manifestações Clínicas

A mutação que determina a HbS é de ponto único, mas o gene falciforme apresenta natureza pleiotrópica com múltiplas expressões fenotípicas associadas a interações genéticas complexas e modificadoras que não são bem compreendidos.^{59 60} As complicações desta doença são numerosas e afetam todos os órgãos e / ou tecidos no corpo. Podem ser divididas em três tipos principais: (1) síndromes de dor e questões relacionadas; (2) anemia e exacerbações (3) danos em órgãos ou tecidos.

3.8.1 Anemia

A maioria dos pacientes com AF têm algum grau de anemia, com tendência a ser mais grave em indivíduos com hemoglobina SS e S β^0 talassemia. Algumas complicações como o sequestro esplênico, crise aplástica e crise hiper-hemolítica, podem levar à exacerbação aguda da anemia.

3.8.2 Sequestro esplênico

Sequestro esplênico agudo resulta do aprisionamento de células vermelhas nos seios esplênicos, levando ao aumento repentino do baço, que pode chegar a enormes proporções, hipovolemia e queda abrupta da hemoglobina, associada à reticulocitose. Estes episódios são geralmente associados a infecções virais ou bacterianas. Os pacientes apresentam palidez, taquicardia, taquipnéia, fraqueza, dor, distensão abdominal, e choque. Trombocitopenia ligeira também pode ocorrer. Deve ser tratado com urgência devido ao seu potencial risco de vida. O estudo cooperativo da doença das células falciformes (CSSCD) define sequestro esplênico agudo como diminuição da hemoglobina em pelo menos 20% da Hb basal, associado ao aumento do tamanho do baço palpável de, pelo menos, dois centímetros da linha de base⁶¹. A maioria dos casos de sequestro esplênico agudo ocorrem entre 3 meses a 5 anos de idade, mas tem sido relatado em lactentes jovens como cinco semanas⁶². A taxa de recorrência de um episódio agudo de risco

de vida de sequestro esplênico é alta, ocorrendo em cerca de 50% das pessoas que sobrevivem ao primeiro episódio.⁶³ Para eliminar a recorrência, alguns pesquisadores têm recomendado esplenectomia eletiva após primeiro episódio⁶⁴, enquanto outros, citando preocupações com a sepses pós-esplenectomia, sugerem esplenectomia após dois episódios de sequestro.⁶⁵

3.8.3 Episódios Dolorosos

A Síndrome dolorosa na AF pode se manifestar de forma aguda ou crônica. No quadro agudo, a dor está associada à isquemia tecidual aguda causada por vaso-oclusão. A topografia mais frequentemente relatada abrange membros inferiores e superiores. É a principal causa de admissão hospitalar em adultos e crianças, sendo mais frequente entre adolescentes e adultos jovens. A forma de apresentação mais frequente no lactente entre 6 meses a 2 anos de idade é a dactilite (síndrome mão-pé).⁶¹

A dor é a principal manifestação na perspectiva do paciente.³⁹

3.8.4 Síndrome Torácica Aguda

Síndrome Torácica aguda é a segunda causa de admissão hospitalar a partir de 2 anos de idade, a principal causa de hospitalização em UTI e a causa mais comum de morte entre os pacientes com anemia falciforme.^{61 66} É uma forma aguda de lesão pulmonar que apresenta gravidade variável, sendo que 13% dos pacientes necessitam de ventilação mecânica e 3 % morrem.⁶⁷ As manifestações clínicas da síndrome torácica aguda (STA) incluem dor no peito, taquipnéia, febre, hipóxia, dispneia, tosse, leucocitose, redução do nível de Hb, e novos infiltrados na radiografia de tórax.^{68 69} Nem todos estes sinais e sintomas ocorrem em todos os casos de STA, com exceção dos novos infiltrados pulmonares, que são considerados a condição *sine qua non* para o diagnóstico. A presença de novos infiltrados com alguns dos outros sinais e sintomas é normalmente suficiente para fazer o diagnóstico. Se uma radiografia anterior não estiver disponível, o infiltrado em questão é considerado como novo. Esta descrição demonstra que existem

lacunas em fazer um diagnóstico preciso. Não existe um acordo sobre o número e natureza dos sinais e sintomas de acompanhamento para fazer o diagnóstico. Além disso, um paciente ocasional pode ter todos os sinais e sintomas acima mencionados sem novo infiltrado na radiografia do tórax gerando assim um dilema para o diagnóstico. A STA, como outras síndromes, é um espectro de manifestações clínicas que variam de leve a muito grave.⁶⁹

A incidência de STA é cerca de três vezes mais comum em crianças do que em adultos, sendo mais grave em adultos.⁷⁰ Em ordem decrescente a incidência predomina em HbSS, S β^0 talassemia, HbSC e S β^+ talassemia. A incidência da STA diminui na presença de alto nível de Hb F e anemia grave é diretamente proporcional à contagem de glóbulos brancos no estado estacionário.⁷¹

As causas de STA incluem pneumonia, embolia gordurosa da medula óssea, infarto pulmonar e infarto em costelas, esterno, levando a hipoventilação pulmonar e atelectasias, mas em 50% dos casos a etiologia não tem etiologia identificável.⁷⁰ Etiologias infecciosas incluem Clamídia, micoplasma, vírus sincicial respiratório, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, parvovírus e rinovírus em ordem decrescente de frequência.⁷²

STA está intimamente associada com crises de dor aguda, especialmente em adultos. Cerca de 50% dos episódios de STA ocorrem após a internação para crises dolorosas agudas.⁶⁷

3.8.5 Complicações Neurológicas

AF é a principal causa de Acidente Vascular Encefálico (AVE) em crianças. Frequentemente está associado à vasculopatia afetando a carótida distal interna e artérias cerebrais médias. O mecanismo do AVE permanece incerto, mas alguns fatores contribuem para a vasculopatia como anemia, leucocitose, hipoxemia, alteração na reologia da hemácia, produzindo dano endotelial, deficiência funcional de óxido nítrico associado à hemólise^{29, 73} e regulação prejudicada do fluxo sanguíneo causando hiperemia.^{74 75} Estima-se que 11% dos pacientes com doença falciforme terão um acidente vascular cerebral até a idade de 20 anos.⁷⁶ A vasculopatia pode ser detectada em um estágio inicial através do Doppler transcraniano.

Infarto cerebral silencioso é a principal causa de injúrias neurológicas em crianças com anemia falciforme, com um risco acumulado de 37% na idade de 14 anos.⁷⁷ Crianças com anemia falciforme e infarto cerebral silencioso tem um aumento de risco para outros problemas neurológicos, incluindo derrame⁷⁸ e redução da função cognitiva⁷⁹ O estudo STOP demonstrou previamente que a transfusão regular de sangue pode diminuir o risco de derrame em crianças com anemia falciforme e achados ultrassonográficos anormais no Doppler transcranianos.⁸⁰ Baseado nestes achados, a Associação Americana de Cardiologia/ Associação Americana de Derrame recomendam transfusão para estes pacientes⁸¹ com objetivo de manter a Hb > 9 g/dl e HbS < 30%.

3.8.6 Hipertensão pulmonar

A hipertensão pulmonar tem sido cada vez mais reconhecida como uma complicação da AF em adolescentes e adultos.

Em três estudos prospectivos realizados em adultos^{12, 82, 83} em que foi utilizada a ecocardiografia para medir a velocidade de regurgitação tricúspide, 20% dos participantes apresentaram elevação leve da pressão arterial pulmonar estimada, definida por uma pressão sistólica da artéria pulmonar maior que 35 mm Hg (o limite superior do normal é de 32 mm Hg) e 9% apresentaram moderada a grave hipertensão pulmonar (> 45 mm Hg). Os valores da pressão pulmonar foram inferiores aos observados em pacientes como Hipertensão Pulmonar Idiopática ou hereditária, porém o risco de morte associado à hipertensão pulmonar leve permaneceu elevado. Bachir *et al.* na França.⁸⁴

realizaram estudo prospectivo com 403 adultos com AF e encontraram taxa de 72% falso-positivo de hipertensão pulmonar após cateterização cardíaca, concluindo uma superestimação de hipertensão pulmonar pelo método ecocardiográfico, mas a ocorrência de hipertensão pulmonar continuou elevada em comparação a outras doenças associadas ao seu desenvolvimento e, todas as mortes ocorreram nos pacientes com hipertensão pulmonar.

Fatores de risco, como hipoxemia, apneia do sono, doença tromboembólica pulmonar, doença pulmonar restritiva, disfunção diastólica e disfunção sistólica

ventricular esquerda, anemia grave e sobrecarga de ferro precisam ser identificados e tratados.

As opções de tratamento incluem hidroxycarbamida (HDX), com transfusões de sangue regulares, se não apresentar resposta a HDX isoladamente.⁵⁸

3.8.7 Priapismo

O priapismo é uma ereção dolorosa indesejada e persistente, que pode durar de horas a dias. Ela é diagnosticada baseada em auto-relato do paciente. Durante o exame físico o pênis poderá estar totalmente ereto e haver queixa de dor no pênis e / ou escroto. Não existem estudos controlados sobre esta complicação da AF. A maioria dos relatos na literatura são relatos de casos ou estudos observacionais.⁸⁵ Os mecanismos fisiopatológicos não são bem compreendidos e parecem pertencer a uma combinação de hipóxia e fluxo de sangue venoso peniano prejudicado.⁸⁶ Cerca de 75% de priapismo ocorrem entre meia-noite e seis horas e após a relação sexual.⁸⁷

Acidose resultante da desidratação e hipoventilação durante o sono podem ser fatores desencadeantes. O priapismo afeta 35% dos meninos e homens.

Trombocitose, baixo nível de Hb F, e gravidade da hemólise são relatados como fatores de risco de priapismo.⁸⁸ Estudos recentes têm ligado a gravidade da hemólise a priapismo, úlceras de perna, e hipertensão pulmonar.¹³ Estas associações, no entanto, foram contestadas por outros pesquisadores.⁸⁹

O priapismo em homens adultos com AF parece ser um marcador de doença grave e identifica os pacientes que estão em risco para outros sinais de falência de órgãos relacionados com a síndrome de células falciformes.⁸⁸

3.9 A Hidroxycarbamida

A Hidroxycarbamida (HDX) é uma droga citotóxica que aumenta a concentração da HbF o que é benéfico em pacientes com AF. Outras drogas têm efeito semelhante, mas a HDX foi escolhida por sua eficácia oral e baixa toxicidade. Outros efeitos posteriormente foram observados como o aumento de hemoglobina,

diminuição da concentração de plaquetas e da contagem de células brancas, alteração da expressão de moléculas de adesão ⁹⁰ e da produção do óxido nítrico. ⁹¹ Em um ensaio clínico randomizado a HDX diminuiu a frequência de episódios dolorosos, de síndrome torácica aguda, necessidade de transfusão sanguínea, e de internamento hospitalar em pacientes com anemia falciforme. ⁹²

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme ⁹³ determina que crianças maiores de três anos possam ser incluídas no protocolo. A **figura 8** representa o mecanismo de ação da hidroxiuréia.

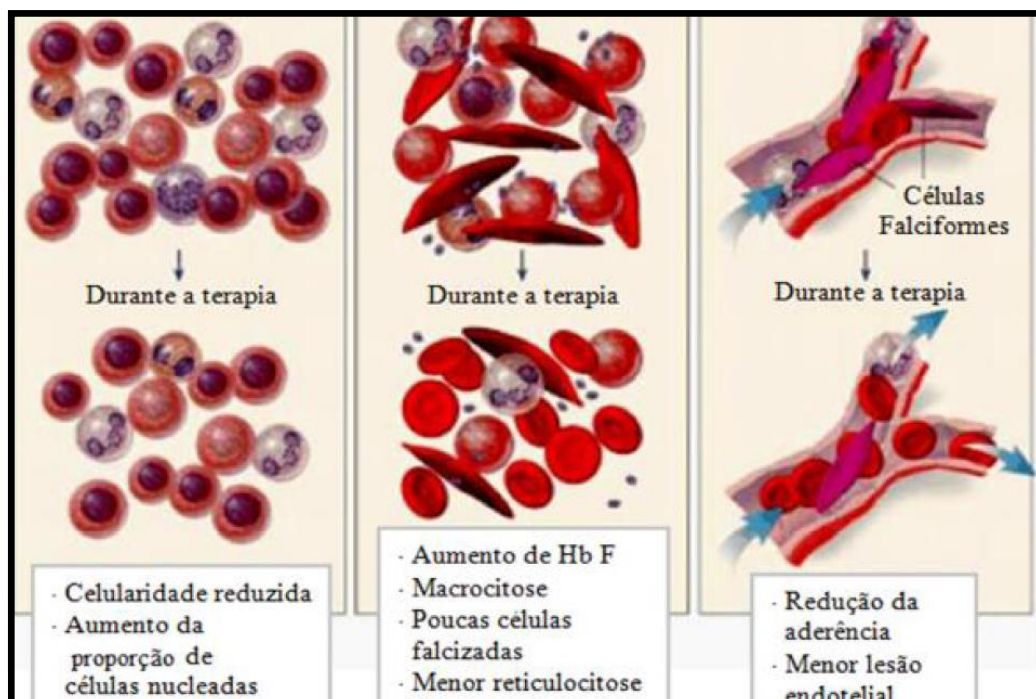


Figura 8: Mecanismo de ação da Hidroxiuréia

Fonte: STEINBERG 1999 ⁹⁴

3.10 Avaliação da Função Endotelial através da VMF

A alteração da função endotelial precede o desenvolvimento das alterações ateroscleróticas morfológicas e pode também contribuir para o desenvolvimento da lesão e das complicações clínicas finais. ⁹⁵ A observação do papel central do endotélio no processo da doença aterosclerótica levou ao desenvolvimento de métodos com o objetivo de testar os diferentes aspectos da sua função, que incluem medidas tanto da injúria quanto do reparo endotelial. Isso providenciou não apenas novas descobertas sobre a fisiopatologia, mas também uma oportunidade clínica de

detecção precoce da doença. Seu estudo possibilitou também quantificar o risco, julgar respostas às intervenções designadas para prevenir a progressão da doença em estágios precoces e reduzir os eventos adversos tardios nos pacientes. ⁹⁶

A função endotelial pode ser avaliada através de diferentes abordagens: (1) aferição de determinadas características mecânicas do vaso e da parede vascular (por exemplo, a espessura das camadas íntima e média, complacência, distensibilidade e índices de remodelação); (2) determinação de marcadores endoteliais solúveis como fator de Von Willebrand, ativador de plasminogênio, inibidor de moléculas de adesão, complexos trombotomodulina e N-óxidos; (3) avaliação da regulação do tônus vascular endotélio-dependente. ^{97 98}

Em 1992, foi descrito um teste não invasivo utilizando ultrassom para acessar a função vascular de uma artéria de condutância na circulação sistêmica. ²¹ Nesse método, o diâmetro da artéria braquial é medido antes e depois de um aumento do *shear stress*, que é induzido por hiperemia reativa (FMD). Quando um *cuff* de esfigmomanômetro colocado no antebraço é insuflado e liberado 4 a 5 minutos após, a VMF ocorre predominantemente como um resultado da liberação endotelial de NO. ⁹⁷ **Figura 9**

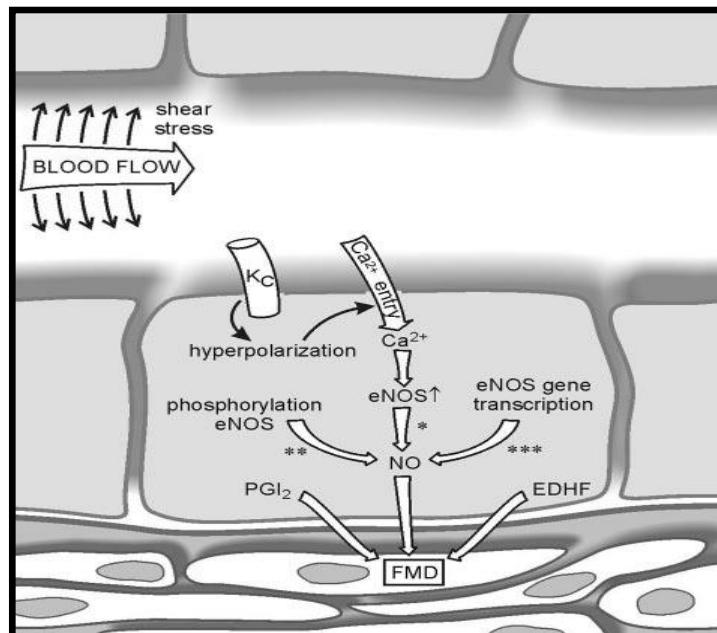


Figura 9. Gênese da Vasodilatação mediada por fluxo.

Shear-stress (tensão de cisalhamento), eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial), PGI₂ (prostaciclina), EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio), Kc (canais de potássio e cálcio ativados), FMD (dilatação mediada por fluxo). FONTE; An L. Moens 2005. ¹⁶

Este método pode ser realizado avaliando a resposta vasodilatadora endotélio-dependente nas artérias radial, axilar e femoral. Diâmetros inferiores a 2,5 mm não são recomendados por serem difíceis de medir. Alguns fatores podem interferir na função endotelial como idade (VMF diminui com a idade), sexo, Hipertensão arterial sistêmica, Diabetes, Tabagismo, Hipercolesterolemia, obesidade, baixo peso ao nascimento, Hiper-homocisteinemia, doença cardiovascular, aumento de catecolaminas (stress), estrógeno, ingestão de açúcar e gordura. A VMF também sofre variação diurna e por isso recomenda-se que os exames sejam realizados entre 7:00 e 10:00h da manhã. Importante, que os testes sejam realizados por um único examinador para garantir uma elevada reprodutibilidade.¹⁶

Em pessoas saudáveis, a VMF é de 7 a 10% de ^{99, 100, 101} diâmetro da linha de base, mas em pacientes com doença cardiovascular a VMF é deficiente ou ausente, com valores de 0 a 5%. ¹⁶ Em crianças e adolescentes não existem valores estabelecidos. Järvisalo *et al* através de estudo com amostra de 105 crianças saudáveis com média de idade 10 anos (variação de 9 a 16 anos), sugere utilizar como limite inferior da normalidade valores da VMF abaixo do percentil 10 ¹⁰² Andrade et al estudando valores normais da VMF em adolescentes normotensos sem fatores de risco para HAS também utiliza o critério do percentil 10 como limite inferior da VMF. ¹⁰³

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo do tipo seccional, analítico com grupo de comparação

4.2 Período do Estudo

O estudo ocorreu entre março de 2013 e junho de 2015. A coleta de dados foi realizada de 1º de junho de 2014 a 31 de março de 2015.

4.3 População Alvo

Crianças e adolescentes com anemia falciforme para o grupo doente e crianças e adolescentes saudáveis para o grupo de comparação.

4.4 População Acessível

Crianças e adolescentes de 6 a 18 anos de idade, com diagnóstico de Hemoglobinopatia SS, matriculadas e acompanhadas no Ambulatório de Hematologia do Ambulatório Magalhães Neto – Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA e na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), centros de referência no atendimento e tratamento de doenças hematológicas.

Crianças e adolescentes da mesma faixa etária, sem doença falciforme e sem outras doenças agudas ou crônicas, matriculadas no ambulatório docente-assistencial de pediatria geral do Hospital Geral Roberto Santos (HGRS) / Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMS) e no ambulatório de Hebiatra do Ambulatório Magalhães Neto – Complexo HUPES da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA.

A faixa etária do estudo foi selecionada por razões técnicas para a realização do teste de disfunção endotelial.

4.5 Amostra

4.5.1 Técnica de Amostragem

Foi obtida amostra de conveniência de crianças e adolescentes nos ambulatórios de acompanhamento e que preenchiam os critérios de elegibilidade.

4.5.2 Cálculo do tamanho amostral

O tamanho da amostra foi calculado baseado no desvio padrão da média de dilatação da artéria braquial, obtido em trabalho publicado na literatura de 0,2, para detectar diferença de 0,25, ²² considerando alfa de 0,05 e poder de 90%. Total de 30 indivíduos, 15 com HbSS e 15 sem hemoglobinopatia. Considerando dificuldades técnicas com a faixa etária pediátrica definiu-se 60 indivíduos, 20 em uso de hidroxiuréia, 20 em não uso de hidroxiuréia e 20 sem hemoglobinopatias, o cálculo foi executado através do programa de estatística WinPepi®.

4.6 Critérios de elegibilidade

4.6.1 Critérios de inclusão

4.6.1.1 Grupo HbSS

- Faixa etária de 6 anos a 18 anos
- Hb SS diagnosticado por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta performance
- Ausência de eventos agudos há um mês
- Sem quadros infecciosos há um mês
- Assinatura do TCLE, indicando concordância em participar do estudo;

4.6.1.2 Grupo sem HbSS

- Faixa etária de 6 a 18 anos

- Aparentemente saudáveis, sem diagnósticos de patologias agudas.
- Hb AA, obtida por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta performance
- Ausência de infecções no último mês
- Indicador IMC/idade abaixo do escore Z +2, segundo curva da OMS
- Ausência de doenças crônicas
- Assinatura do TCLE, indicando concordância em participar do estudo;

4.6.2 Critérios de exclusão

4.6.2.1 Grupo HbSS

- Acidente vascular encefálico prévio
- Transfusão sanguínea há menos de 3 meses

4.6.2.2 Grupo sem HbSS

- Quadros infecciosos agudos, durante o processo de realização de exames.
- Doenças crônicas
- Dislipidemia

4.7 Definições e Operacionalização das Variáveis

4.7.1 Variáveis Dependentes

Vasodilatação mediada por fluxo (%), descrita como contínua e Disfunção endotelial, descrita como dicotômica, considerando VMF abaixo do 10^o percentil do grupo saudável conforme as referências Jarvisalo 2004 ¹⁰² e Andrade 2005.¹⁰³

4.7.2 Variáveis Independentes

4.7.2.1 Variáveis clínicas e sociodemográficas

Sexo (M, F), idade (a), índice de massa corpórea (Kg/m²), Saturação periférica de oxihemoglobina (%), Pressão arterial sistólica e diastólica (mm Hg) número de crises vasclusivas (CVO) no último ano, número de atendimento em unidade de urgência-emergência por CVO no último ano, número de internações por CVO no último ano, episódios de STA no último ano, tempo de internamento por STA (dias), episódios de pneumonias no último ano, ocorrência de osteomielite, priapismo, osteonecrose, sequestro esplênico, esplenectomia, número de transfusões no último ano, número de transfusões até o momento do estudo, uso ou não de hidroxiuréia (HDX).

4.7.2.2 Variáveis laboratoriais

Hematócrito (%), hemoglobina (g/dl), volume globular médio (fL), concentração de hemoglobina corpuscular média (pg), leucograma (x10³/L), plaquetas (x10³/L), reticulócitos (%), Lactato desidrogenase (U/L), transaminases (U/L), bilirrubinas totais (mg/dl), bilirrubina indireta (mg/dl), bilirrubina direta (mg/dl), colesterol total (mg/dl), LDL-c (mg/dl), HDL-c (mg/dl), triglicérides (mg/dl), glicemia (mg/dl), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (mg/L). Foi utilizado como valor de corte para inflamação sistêmica e exclusão do estudo valores de PCR maior e igual a 10 mg/L. A velocidade de fluxo sanguíneo na artéria cerebral média direita e esquerda (cm/s) foi descrita como contínua e a classificação do Doppler transcraniano foi descrita como categórica. Utilizado critério de Adams *et al* que definiu os valores para a velocidade de fluxo sanguíneo: até 170 cm/s (normal); de 170 a 200cm/s (condicional); e maiores que 200cm/s (crítico/anormal), com risco alto de desenvolver AVE em crianças de 2 a 16 anos.¹⁰⁴

4.7.3 Definição de eventos clínicos

Crise vasclusiva: ¹⁰⁵ manifestação dolorosa com necessidade de analgesia.

Crise vasoclusiva com incapacidade física: CVO com limitação para atividades laborativas ou frequência à escola.

Síndrome torácica aguda: ^{68,69, 70, 106, 107} infiltrado pulmonar novo envolvendo pelo menos um segmento do pulmão, afastado atelectasia, com uma ou mais das seguintes manifestações: dor torácica, taquipnéia, tosse, sibilância, aumento do trabalho respiratório e/ou hipoxemia (paO₂ < 60 mmHg ou SpO₂ abaixo de 2% do basal).

Acidente Vascular Encefálico: ¹⁰⁸ Alterações de consciência, déficits neurológicos focais, convulsões, paresias, afasia, confusão mental e cefaleia de grande intensidade ou duração associada a lesões de isquemia ou hemorragia na Ressonância magnética do crânio.

Priapismo: ¹⁰⁸ ereção dolorosa indesejada e persistente.

Sequestro esplênico: ^{61, 108} diminuição da hemoglobina em pelo menos 20% da Hb basal, associado ao aumento do tamanho do baço palpável de, pelo menos, 2 centímetros da linha de base.

4.7.4 Critérios de gravidade ^{93, 109}

- Três ou mais episódios de crises de dor/ano com necessidade de atendimento médico hospitalar.
- Síndrome torácica aguda: dois ou mais eventos/ano
- Hipoxemia crônica: saturação de oxigênio persistentemente menor que 94%.
- Comprovação de lesão crônica de órgão (priapismo, necrose óssea)
- Concentração de Hb persistentemente menor que 7 g/dl
- Contagem de leucócitos maior que 20 x 10³μ/L na ausência de infecção
- Duas medidas consecutivas do fluxo das artérias cerebrais média ou anterior por Doppler transcraniano com velocidade entre 170 e 199 cm/s (inclui pacientes com história prévia de isquemia cerebral transitória)

- Desidrogenase láctica maior que duas vezes o valor superior de normalidade (LDH > 960 U/L)

4.7.5 Definição de critérios de dislipidemia ¹¹⁰

Colesterol total > 170 mg/dl

HDL- c < 45 mg/dl

LDL- c > 130 mg/dl

Triglicérides > 130 mg/dl

4.8 Protocolo de coleta de dados

4.8.1 Avaliação clínica através de questionário estruturado

Os pacientes foram alocados no momento da visita aos ambulatórios de acompanhamento e entraram no estudo após representante legal e paciente, anuírem ao consentimento livre e informado. Um questionário padrão foi utilizado para obtenção de dados clínicos e sociodemográficos, complementados com informações do prontuário. (Anexo 1)

4.8.2 Exame físico

4.8.2.1 *Peso*

Utilizado balança digital

- a) Remover casaco, objetos e sapatos.
- b) Calibrar o zero.
- c) Posicionar a criança ou adolescente no centro da plataforma, com os dois pés.
- d) Fazer a leitura em quilogramas, com aproximação de 100g, de acordo com a escala.

4.8.2.2 Altura

Foi utilizado estadiômetro portátil com precisão de 0,1cm

- a) Remover sapatos e acessórios de cabelo que possam interferir na medida feita em centímetros.
- b) Manter posição ereta, com as mãos ao lado do corpo e joelhos e calcanhares juntos, tocando a base vertical.

4.8.2.3 IMC

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula de Quetelet: quociente do peso pelo quadrado da altura (kg/m²).

Classificação, segundo referência da OMS (2007) ¹¹¹ - faixa etária de 6 a 19 anos

Magreza acentuada escore $z < - 3$

Magreza escore $z > - 3$ e $< - 2$

Eutrófico escore $z > - 2$ e $< +1$

Sobrepeso escore $z > +1$ e $< +2$

4.8.2.4 Medida da pressão arterial (PA)

Foi realizada após 5 minutos de repouso, na posição sentada. Foram utilizados manguitos nos tamanhos 12 e 14 cm de largura e 36 e 53 cm de extensão, a depender do comprimento e circunferência do braço. A largura do manguito ocupou 40% do comprimento do braço, medida no ponto médio entre o cotovelo e o acrômio, e o comprimento, 80 a 100% desta medida. O manômetro utilizado foi de coluna de mercúrio. A medida da pressão arterial foi feita com a campânula do estetoscópio colocada 02 cm acima da fossa cubital direita, sobre o pulso braquial, identificado por palpação digital, com o membro apoiado à altura do coração. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida quando do aparecimento dos sons cardíacos (fase I de Koroktoff) e a pressão arterial diastólica (PAD) quando do seu

desaparecimento (fase V); ¹¹² o valor final da PA representou a média de três medidas consecutivas, medidas com intervalos de 60 segundos.

4.8.2.5 Oximetria de pulso

A saturação arterial da oxihemoglobina (SpO₂) diurna, em repouso, foi avaliada por um oxímetro de pulso (Oximed), durante dez minutos, logo após a chegada da criança ao serviço, estando a criança tranquila, no dia da sua inclusão no estudo.

4.8.3 Avaliação da função endotelial

Para avaliação da função endotelial, empregamos protocolo estabelecido segundo Diretrizes para a avaliação ultrassonográfica da artéria braquial. Os exames foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular - EBMSP após agendamento prévio, em equipamento VIVID 3 General Electric Company - Israel, com transdutor multifrequencial de 7 a 12 MHz. A função vasomotora dependente do endotélio foi avaliada por dilatação mediada pelo fluxo com hiperemia reativa. Os exames foram realizados com os pacientes em jejum de 4 h, após repouso de 30 minutos, com temperatura da sala controlada para 20 a 25°C. Para evitar variações circadianas todos os exames foram realizados no período matutino. Os pacientes foram examinados em decúbito dorsal, com o braço esquerdo posicionado ergonomicamente; eletrocardiograma sincronizado; verificação da frequência cardíaca e pressão arterial antes, durante e após o exame. A braçadeira do esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, exercendo a função de um torniquete pneumático envolvendo o braço direito acima da prega do cotovelo; a artéria braquial identificada em secção longitudinal e posteriormente identificados a luz, o centro e a interface lúmen-íntima da parede anterior e posterior do vaso; a amostra de Doppler posicionada em ângulo de 60°; adequação de controles da escala de cinza, profundidade, filtro e escala do Doppler. O aumento do fluxo foi induzido pela insuflação do torniquete ao redor do braço até 250 mmHg, por quatro minutos, com monitorização contínua da imagem da artéria seguida de desinsuflação do

torniquete, levando à hiperemia reativa; monitorização dos primeiros cinco fluxos (mensuração da velocidade máxima Doppler) e do diâmetro da artéria, durante 120 segundos (para medida do diâmetro ao final de 60 segundos). Vale ressaltar que o exame foi muito bem tolerado pelos participantes, não havendo referência de qualquer desconforto que tenha necessitado da interrupção do teste. Os exames foram realizados por médico com treinamento específico para realização do exame e com comprovada experiência na técnica.^{20, 113, 114} Nas figuras abaixo estão apresentadas as principais etapas da avaliação da função endotelial (arquivo próprio figuras 10, 11, 12, 13) e 14.

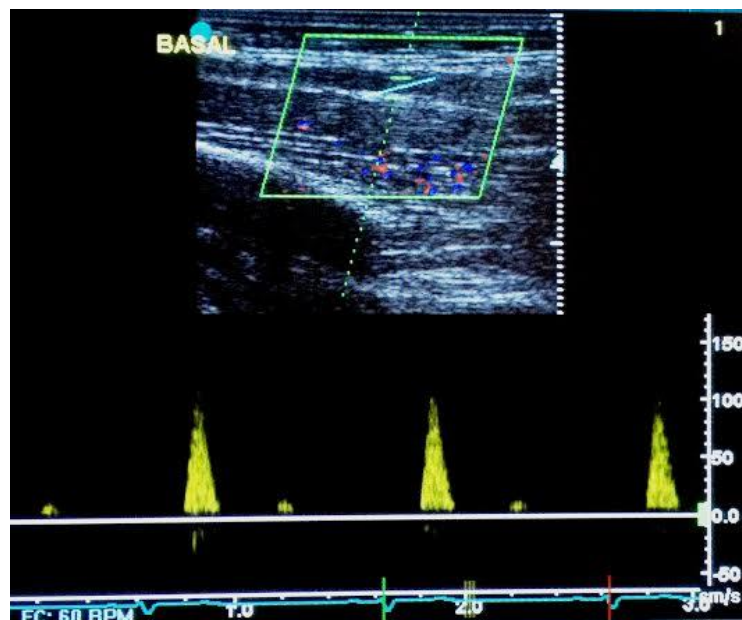


Figura 10. Determinação do fluxo da artéria braquial no estado basal através do Doppler pulsado

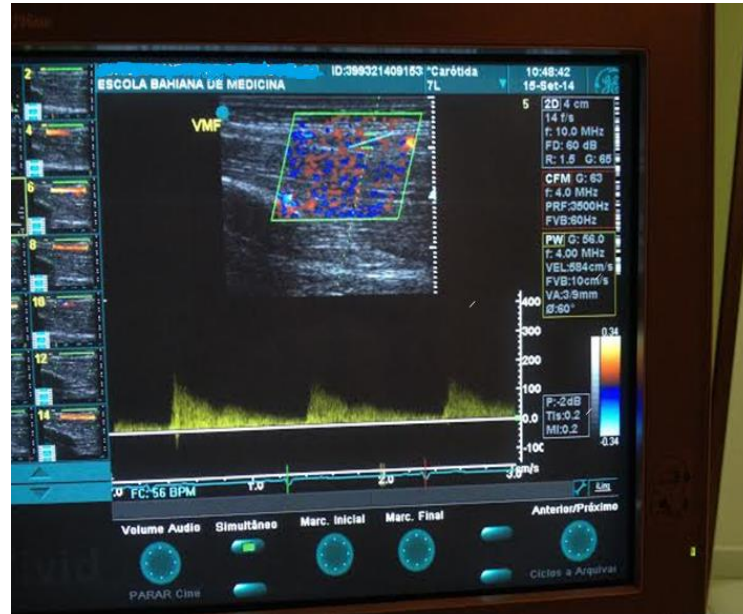


Figura 11. Determinação do Fluxo da artéria braquial através do Doppler pulsado no período de hiperemia reativa



Figura 12. Diâmetro da artéria braquial através de ultrassonografia de alta resolução no estado basal

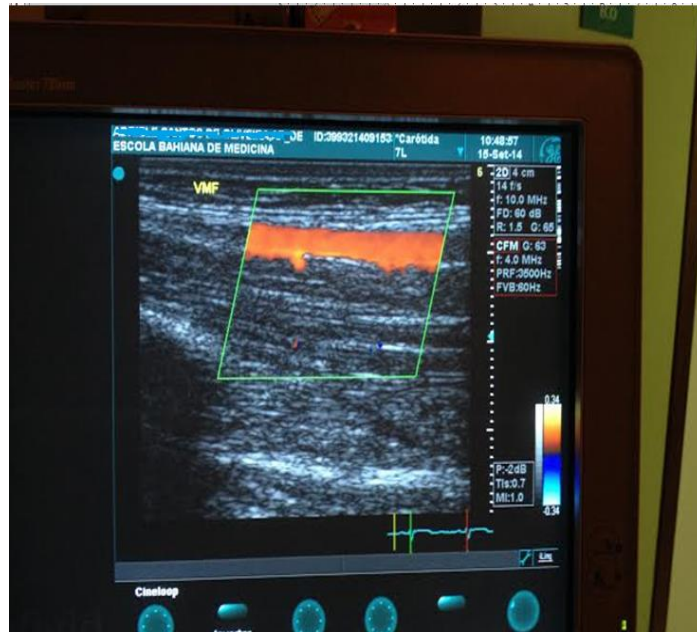


Figura13. Diâmetro da artéria braquial através de ultrassonografia de alta resolução no período de hiperemia reativa

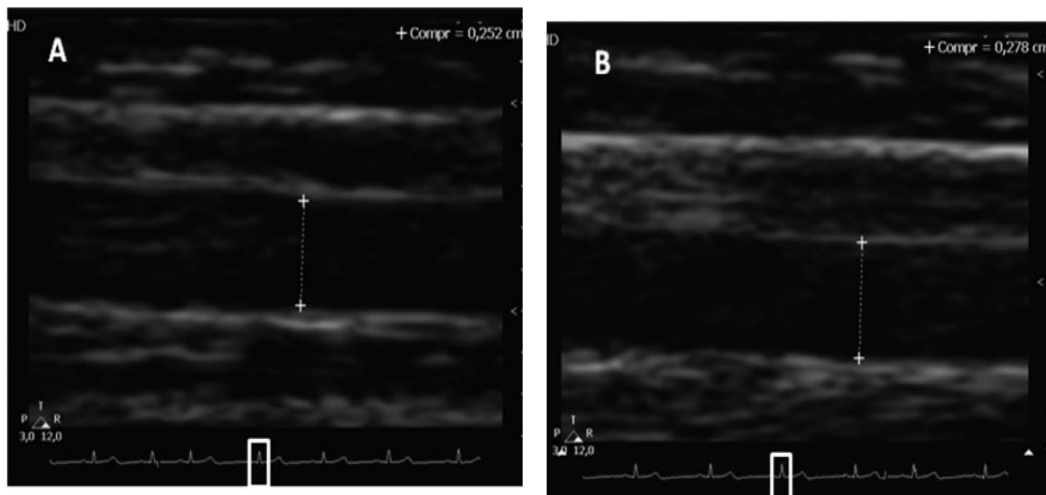


Figura 14. Dilatação mediada por fluxo (%) = (diâmetro B - diâmetro A / diâmetro A) x 100

Fonte: Costa et al 2012.¹¹⁵

4.8.4 Coleta de sangue

Realizado por técnico habilitado e com experiência comprovada, no ADAB-EBMSP. Cerca de 10 ml de sangue foram colhidos por punção venosa, de cada paciente, após jejum mínimo de 12 horas, em frascos secos para as dosagens bioquímicas e frasco com EDTA para realização de hemograma. Após centrifugação, o soro foi armazenado em freezer, a -80°C . Foram dosados:

Colesterol total (CT), HDL-C, TG. As dosagens do CT, HDL-C e triglicérides (TG) foram realizadas por métodos enzimáticos, em laboratório de referência. O LDL-C foi calculado pela fórmula Friedwald: $LDL-c = [(CT - HDL-c) - TG/5]$, com TG <400mg/dl. PCR quantitativa de alta sensibilidade foi mensurada pelo método de turbidimetria.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 Hipótese nula

Não existe diferença entre a função endotelial de crianças e adolescentes com AF e indivíduos da mesma faixa etária sem hemoglobinopatia.

Não existe diferença na função endotelial de crianças e adolescentes com AF em uso e não uso de HDX.

Disfunção endotelial não apresenta correlação com manifestações clínicas e laboratoriais em AF.

5.2 Hipóteses alternativas

Crianças e adolescentes com AF apresentam comprometimento da função endotelial quando comparadas a indivíduos da mesma faixa etária sem hemoglobinopatia.

Existe diferença na função endotelial entre os grupos de crianças e adolescentes em uso e não uso de Hidroxiuréia.

Disfunção endotelial associa-se a manifestações clínicas e laboratoriais em AF.

5.3 Estatística Descritiva

Para a análise descritiva, as variáveis quantitativas foram representadas por suas médias e desvios-padrão quando suas distribuições foram normais e por medianas e intervalos interquartis quando não normais. As variáveis categóricas foram representadas através de frequências simples e porcentagens. Para testar a hipótese de que os dados apresentavam uma distribuição normal foram aplicados os testes de normalidade: *Kolmogorov-Smirnov* e o *Shapiro Wilk*.

Todas as variáveis colhidas dos pacientes foram transferidas para o banco de dados do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0, ano 2012 e analisados pelo mesmo pacote estatístico.

5.4. Análise Bivariada e Multivariada

Para comparação de variáveis categóricas foi utilizado, através de análise bivariada o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando necessário. Para comparação das médias foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes e Mann Whitney para comparar medianas de variáveis numéricas com distribuição não paramétrica. Por meio da correlação de Spearman foram verificadas associações entre variáveis numéricas e VMF dos pacientes HbSS. Para comparar médias de variáveis numéricas com mais de dois grupos categorizados foi utilizado ANOVA com correção de Bonferroni ou Kruskal Wallis, para comparação de ranks, se distribuição não paramétrica.

A análise multivariada para investigação de fatores associados à dilatação média foi feita através de um modelo de regressão linear, tomando dilatação como variável dependente. O número de pacientes, ou tamanho amostral limitante m , determinou o número de variáveis incluídas tomando uma postura conservadora ($n_{\max} = m/10$). As variáveis avaliadas para o modelo foram selecionadas seguindo o algoritmo proposto por Hosmer e Lemeshow (2000)¹¹⁶ sendo estas, as variáveis que apresentaram correlação com $p < 0,2$. O modelo final foi obtido através do método *Backward Stepwise*, mostrando boa adequação se r^2 ajustado apresentasse $p < 0,05$. As análises foram conduzidas com o software IBM *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®, Chicago, IL, EUA) 20.0.

5.5 Aspectos Éticos

Em cumprimento às normas da resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), esta pesquisa foi aprovada pelos comitês de ética da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, parecer nº 568.913 /2014 e CAEE – 17663913.2.0000 5544 (Anexos 8 E 12). O acesso aos dados de registro foi autorizado pelas diretorias do HGRS do HEMOBA e da FMB – UFBA (Anexos 6 e 7).

Quanto aos riscos aos quais os pacientes foram submetidos, consta a exposição dos dados de registros de atendimentos. Os autores se comprometem a manter absoluto sigilo sobre as informações.

6. RESULTADOS

A amostra foi constituída por 40 pacientes com HbSS e 25 crianças e adolescentes saudáveis, que pertenciam ao grupo comparação, com médias de idade em anos e desvio-padrão de $12,3 \pm 3$ (variação de 6 a 17) e $11,4 \pm 3$ (variação de 6 a 18), respectivamente. No grupo HbSS 18 pacientes faziam uso de hidroxiuréia. O sexo masculino predominou entre os pacientes com AF $n = 24$ (60%) *versus* $n = 7$ (28%) do grupo comparação ($p < 0,001$). Os grupos foram diferentes em relação às médias e desvio padrão da hemoglobina ($p < 0,001$), leucócitos ($p < 0,001$), plaquetas ($p < 0,001$), LDH ($p < 0,001$), reticulócitos ($p < 0,001$), TGO ($p < 0,001$), bilirrubina total, ($p < 0,001$), PCR quantitativa de alta sensibilidade ($p = 0,001$) e saturação de oxigênio ($p < 0,001$). O grupo com anemia falciforme apresentou médias mais baixas de colesterol total 122 ± 24 mg/dl (IC95% 114-129; $p < 0,001$), LDL-c $69 \pm 22,5$ mg/dl (IC95% 62-76; $p < 0,001$), HDL-c 33 ± 7 mg/dl (IC95% 31-35; $p < 0,001$) e níveis mais elevados de triglicérides 100 ± 39 mg/dl (IC95% 87-112; $p = 0,005$). Ao compararmos a média do IMC e seu desvio-padrão entre os pacientes com e sem hemoglobinopatia foi encontrado $16,4 \pm 2$ Kg/m² *versus* $18,5 \pm 3,8$ Kg/m² ($p = 0,02$), respectivamente e para o escore z do IMC $-1 \pm 0,87$ *versus* $-0,07 \pm 1,29$ ($p = 0,02$), conforme descrito na **Tabela 2**. A classificação do IMC demonstrou que 86% ($n = 33$) dos indivíduos HbSS e 64% ($n = 16$) dos indivíduos saudáveis eram eutróficos. A proporção de magreza foi maior no grupo HbSS, 12,8% ($n = 5$) vs 8% ($n = 2$) do grupo sem hemoglobinopatia. Magreza acentuada só foi observado em 1 indivíduo da amostra e o mesmo pertencia ao grupo HbSS. Sobrepeso só ocorreu no grupo de comparação 28% ($n=7$). Houve predomínio de não brancos em ambos os grupos, sendo 96% dos indivíduos do grupo comparação e 100% do grupo HbSS.

Tabela 2. Características sociodemográficas e clínicas dos grupos HbSS e grupo comparação em Salvador-BA, entre junho de 2014 a março 2015.

Características	Grupo Hb SS	Grupo sem Hb SS	Valor de <i>p</i>
	Média ± DP n =40	Média ± DP n= 25	
Idade (anos)	12,3 ± 3	11,4 ± 3	0,24
Sexo Masc.(%) *	60	28	0,001
SpO ₂ (%)	95 ± 2,9	98 ± 0,7	< 0,001
PAS (mmHg)	98,47±10,79	93,70±10,89	0,123
PAD (mmHg)	58,26±9,80	59,08±7,66	0,095
IMC (Kg/m ²)	16,4 ± 1,9	18,5 ±2,8	0,002
Escore Z	-1,06 ± 0,9	0,68 ± 1,3	0,002
Hemoglobina (g/dl)	8,0 ± 0,9	13,1 ±1	<0,001
Hematócrito (%)	24 ± 3	39,8 ± 3,4	<0,001
VGM (fL)	90 ± 11	83 ± 5,2	0,004
CHCM (pg)	33,4 ± 4,5	33 ± 1,3	0,080
Leucócitos (x10 ³ /L)	12,4 ± 3,8	7,1 ± 1,7	<0,001
Plaquetas (x10 ³ /L)	455 ± 126	283 ± 46,5	<0,001
Reticulócitos (%)	7,4 ± 4,8	0,7 ± 0,2	<0,001
Lactato desidrogenase (U/L)	1198 ± 567	368 ± 70	< 0,001
TGO (U/L)	49,8 ± 22	20,6 ± 4,2	<0,001
TGP (U/L)	23,5 ± 12	14 ± 3,6	< 0,001
Bilirrubinas totais (mg/dl)	3,2 ± 1,9	0,59 ± 0,7	< 0,001
Bilirrubina indireta (mg/dl)	2,7 ± 1,9	0,46 ± 0,5	< 0,001
PCR as (mg/L) ⁺	2,02 (0,88-3,5)	0,42(0,17-1,63)	0,001
Mediana (P25 e P75)			
Colesterol total (mg/dl)	122 ± 24	155 ± 26	< 0,001
LDL-c (mg/dl)	69 ± 22	92 ± 23	< 0,001
HDL-c (mg/dl)	33 ± 7	46 ± 12	< 0,001
Triglicérides (mg/dl)	100 ± 39	74 ± 25	0,005
Glicemia (mg/dl)	80 ± 10	87 ± 10	0,040

Nota: * X², + Mann Whitney, Teste t de student para as demais variáveis. PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), SpaO₂ (saturação periférica de oxihemoglobina), VGM (volume celular médio) CHCM (concentração de hemoglobina celular médio); TGP (alanina aminotransferase) TGO (aspartato aminotransferase); PCR as (proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade); HDL (lipoproteína de alta densidade-colesterol), LDL (lipoproteína de baixa densidade-colesterol).

Os pacientes com anemia falciforme que não usavam hidroxiuréia foram semelhantes aos pacientes em uso desta medicação, considerando-se

características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais, exceto para a desidrogenase láctica ($p=0,03$) e aspartato aminotransferase ($p=0,02$), mais elevadas no grupo em não uso de hidroxiuréia. (Tabela 3 e 4). Variáveis relacionadas à evolução da doença antes da introdução da HDX como sequestro esplênico e manifestações agudas com maior gravidade, como crise vasclusiva com necessidade de internamento e tempo de internamento por STA tenderam a ser mais elevadas entre os pacientes em uso de HDX. O total de transfusões sanguíneas tomadas até o momento do estudo foi mais elevado no grupo em uso de HDX ($p = 0,001$). O tempo de uso de hidroxiuréia foi variável. O percentual em uso a menos de seis meses foi 11%, a menos de três anos 83% e a mais de três anos 16,7%.

Tabela 3. Caracterização dos grupos sem hidroxiuréia (HDX) e com HDX em Salvador - BA de junho de 2014 a maio de 2015

Características clínicas e	Grupo sem HDX	Grupo com HDX	Valor de p
Sociodemográficas	(n= 22)	(n = 18)	
Idade (a)	12,9 ± 2,8	11,6 ± 3,1	0,17
Média ±DP			
Sexo Masculino (%)	63,6	61	0,87
IMC (Kg/m ²)	16,8 ± 2	16 ± 1,3	0,18
Média ±DP			
Escore z do IMC	-1,0 ± 0,8	-1,1 ± 0,9	0,60
Média ±DP			
Nº CVO ult.ano	1,9 ± 1,7	2, 2 ± 1,9	0,60
Média ±DP			
Nº CVO atend.emergência	0,7 ± 0,4	0,7± 0,5	0,97
Média ±DP			
Nº internamentos CVO	0,8 ± 0,9	1,6 ± 1,7	0,20
Média ±DP			
CVO com limitação física n (%)	14 (63,6)	11 (61)	0,56
Síndrome Torácica Aguda n (%) *	13 (59,1)	14 (77,8)	0,30
Nº STA ult. Ano Media±DP	0,36±0,58	0,33±0,76	0,88
Tempo de intern. STA (dias)	12,7 ± 22,2	17,4 ± 23,4	0,15
Média ±DP			
Uso de oxigênio STA n (%)	9 (40,9)	8 (44,4)	0,70
Transfusão sanguínea STA n (%)	9 (40,9)	9 (50)	0,70
Priapismo n (%)	3 (13,6)	1 (5,6)	0,60
Sequestro esplênico n (%)	2 (9,1)	4 (22)	0,38
Colelitíase n (%)	7 (31,8)	4 (22,2)	0,37
Trasfusões sanguíneas n (%) **	18(81,8))	16(88,9)	0,67
Número transfusões no último ano	0,6 ± 1,13	2,4 ± 5	0,33
Média ±DP			
Nº de transfusões sanguíneas até momento da coleta Média(DP)	5,3 ± 6,0	14,1 ±15,6	0,01
SpO ₂ %			
Média ±DP	94,5 ± 3,5	95,9 ± 2,0	0,14

Nota: Teste Exato de Fisher; teste t de student. CVO (crise vasclusiva); STA (Síndrome Torácica Aguda); * percentual de STA até inclusão no estudo. ** percentual de pacientes que receberam transfusão sanguínea até inclusão no estudo

Tabela 4. Características laboratoriais dos grupos sem hidroxiuréia (HDX) e com HDX em Salvador-Ba de junho de 2014 a maio de 2015

Características laboratoriais Média ± DP	Grupo sem HDX (n=22)	Grupo com HDX (n=18)	Valor de p
Hb (g/dl)	7,8 ± 0,8	8,2 ± 0,95	0,17
HbF (g/dl)	6,3 ± 4,9	8,9 ± 6,9	0,23
Leucócitos (x 10 ³ /L)	12,7 ± 3,3	11,9 ± 4,4	0,50
Plaquetas (x 10 ³ /L)	451,6 ± 111	467,4 ± 146	0,70
Reticulócitos (%)	8,4 ± 5	6,1 ± 4	0,13
LDH (U/L)	1377 ± 603	991 ± 456	0,03
TGO (U/L)	57 ± 23	41 ± 19	0,02
PCR as (mg/L) * +	2,0(0,87-3,51)	2,2(0,87-4,11)	0,76
Colesterol total (mg/dl)	122,6 ± 23	122 ± 26	0,88
LDL-c (mg/dl)	67 ± 24	69,6 ± 23	0,50
HDL-c (mg/dl)	34,6 ± 9,4	33 ± 5,7	0,70
Triglicérides (mg/dl)	104 ± 47	99,5 ± 28,6	0,40

Nota: TGP (alanina aminotransferase) TGO (aspartato aminotransferase); PCR as (proteína C reativa de alta sensibilidade); HDL-C (lipoproteína de alta densidade-colesterol), LDL-C (lipoproteína de baixa densidade colesterol Variáveis expressas em Média ± DP; teste t de student para comparar médias * Mediana (p25 e p75) + teste de Mann Whitney. HbF (hemoglobina fetal)

A Tabela 5 abaixo discrimina a frequência das manifestações agudas em pacientes HbSS, chamando atenção para a alta frequência de indivíduos que já apresentaram crise vasclusiva e episódios de STA.

Tabela 5. Frequência das manifestações clínicas em 40 indivíduos com HbSS até momento da inclusão no estudo conforme questionário aplicado ao paciente

Manifestações clínicas	Sim		Não	
	n	%	n	%
Crise vasclusiva (CVO)	37	92,5	3	7,5
Atend. Emergência CVO	29	72,5	11	27,5
Internamentos CVO	26	65	14	35
Incap. Física CVO	25	62,5	15	37,5
S. Torácica aguda (STA)	27	67,5	13	32,5
Sequestro esplênico	6	15	34	85
Enurese	8	20	32	80
Priapismo	4	16,6	22	83,4
Colelitíase	11	27,5	29	72,5

Em relação a classificação do Doppler transcraniano 80% (n=32) foram normais, 12,5% (n=5) foi condicional, 2,5% (n=1) foi anormal e 5% (n=2) foi assimétrico.

A média e o desvio-padrão da VMF entre os pacientes do grupo HbSS foi menor que no grupo comparação, com valores de , $10,4 \pm 5\%$, mediana 10%, IIQ 7,7 *versus* $18,45 \pm 9\%$, mediana 17%, IIQ 14,5, respectivamente ($p < 0,001$). **Gráfico 1.**

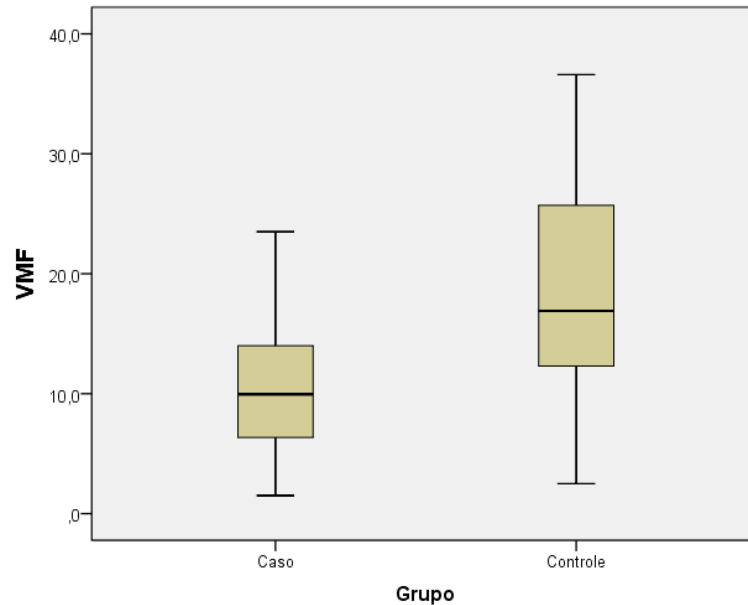


Gráfico 1. Comparação entre as médias da Vasodilatação mediada por fluxo (VMF) dos grupos HbSS e grupo comparação

A média e o desvio-padrão, da VMF entre os sexos masculino e feminino foi $12,9 \pm 8\%$ *versus* $14 \pm 7,7\%$ $p = 0,55$, respectivamente e considerando o escore z de $IMC \leq +1$ e $> +1$ a média \pm DP da VMF foi $13 \pm 7,5$ *versus* $17 \pm 9,5$ $p = 0,16$.

Ao ser comparado a média e desvio-padrão da VMF entre os grupos HBSS em não uso e em uso de hidroxiuréia, não foi observada diferença entre os grupos ($10,8 \pm 4\%$; mediana 11,0 IIQ 6,8% *vs* $9,9 \pm 6\%$; mediana 8,9, IIQ 6,6%, $p = 0,56$, respectivamente). **Gráfico 2.**

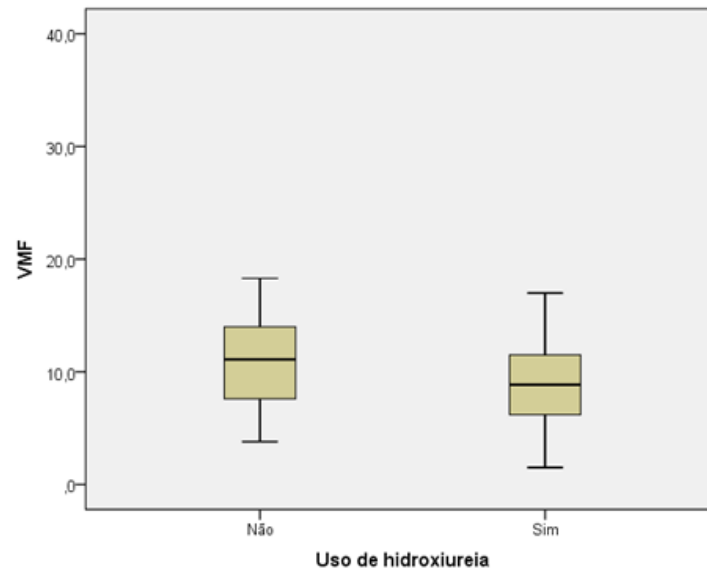


Gráfico 2. Comparação entre VMF (vasodilatação mediada por fluxo) e falcêmicos sem hidroxuriéia e com hidroxuriéia

Quando a VMF dos indivíduos saudáveis ($n=25$) foi distribuída em percentis o valor da VMF no percentil 10 foi 8,38%; no percentil 25 11,95%; no percentil 50 16,90% e no percentil 75 26,4%.

O 10º percentil do grupo saudável foi considerado valor de corte para disfunção endotelial. Comparando os grupos com e sem disfunção endotelial (DE) não houve diferença significativa entre as médias de variáveis clínicas e laboratoriais.

Tabela 6.

Observou-se que 37,5% ($n = 15$), dos pacientes HbSS apresentaram disfunção endotelial e 8 % ($n = 2$) do grupo sem hemoglobinopatia.

Observou-se que o percentual de disfunção endotelial entre os falcêmicos em uso e não uso de HDX foi semelhante $n = 8(44,4\%)$ vs $n = 7(31,8\%)$ $p=0,517$.

Tabela 6 – Comparação de variáveis clínicas, laboratoriais e antropométricas entre 40 pacientes com anemia falciforme, conforme dicotomização da VMF (percentil 10 dos indivíduos saudáveis)

Variáveis	VMF < 8,4% Média(DP) / N* (n=15)	VMF ≥ 8,4% Média (DP) / N* (n=25)	Valor de p
No CVO ult. ano	2,60 (1,92)	1,64 (1,66)	0,119
Nº CVO emerg ult. ano	1,93 (1,94)	1,16 (1,21)	0,305
Nº intern. CVO ult. ano	1,53 (1,64) /15	0,88 (1,08) / 24	0,296
Tempo intern. STA	13,87 (25,73)	14,55 (21,00)	0,406
No STA ult. ano	0,53 (0,83)	0,24 (0,52)	0,305
No transf ult. ano	1,20 (1,90)	1,60 (4,38)	0,439
Total transf	12,64 (16,88) / 14	7,16 (7,71) / 25	0,216
Idade priaprismo (anos)	4,13 (1,55)	3,84 (0,55)	0,720
Idade sequestro(anos)	3,40 (1,30)	3,64 (0,99)	0,679
Hb (g/dl)	7,95 (0,57)	8,12 (1,04)	0,619
HbF (g/dl)	5,94 (4,42) / 13	8,56 (6,82) / 16	0,329
Leucócitos (x 10 ³ /L)	13250 (3006)	11833 (4160)	0,100
Plaquetas (x 10 ³ /L)	467,9 (94,1)	453,2 (144,1)	0,679
Reticulócitos (%)	7,22 (4,15) / 14	7,58 (5,20) / 25	0,965
LDH (U/L)	1201,4 (481,9) / 14	1197,5 (620,3) / 25	0,654
PCR as (mg/L) Mediana(IIQ) *	1,76 (2,24)	2,33(2,75)	0,415
VF ACM dir (cm/s)	128,5 (41,4)	164,4 (175,7)	0,699
VF ACM esq. (cm/s)	189,0 (227,9)	166,9 (175,3)	0,562
Escore Z IMC/i	-1,11(0,87) / 15	-1,04 (0,89) / 24	0,875
PAS (mmHg)	96,07 (10,95) / 14	99,67 (10,60) / 21	0,414
PAD (mmHg)	57,36 (10,46) / 14	58,90 (9,54) / 20	0,769

Nota: * Mann Whitney; demais variáveis Teste t de Student. CVO crise vasclusiva. LDH (Lactato desidrogenase); PCR as (proteína C reativa de alta sensibilidade); VF ACM, (velocidade de fluxo em artéria carótida média); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica).

Quando a VMF dos 40 pacientes HbSS foi distribuída em percentis o valor da VMF no percentil 10 foi 4,2% (n=4) no percentil 25 foi 6,3%, no percentil 50 foi 10% e no percentil 75 foi 14%. Ao compararmos a VMF de pacientes HbSS tomando como ponto de corte o percentil 25 (6,3%), foi observada diferença significativa (p= 0,02) em relação ao número de internamentos por CVO no último ano e tendência a

número de CVO no último ano ser maior no grupo com VMF menor que 6,3%.

Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação de variáveis clínicas, laboratoriais e antropométricas entre 40 pacientes com anemia falciforme, segundo a presença de VMF maior ou menor que 6,3% (percentil 25)

Variáveis	VMF < 6,3% Média(DP) / N* (n=10)	VMF ≥ 6,3% Média (DP) / N* (n=30)	Valor de p
No crises VO	2,80 (1,81)	1,73 (1,74)	0,105
No vezes emerg ano	2,50 (2,06)	1,10 (1,18)	0,670
No intern. por CVO ult. ano	2,20 (1,64)	0,76 (1,00) / 29	0,020
Tempo intern. STA	18,90 (30,64)	13,50 (19,66)	0,520
No STA ult. ano	0,70 (0,94)	0,23 (0,50)	0,160
No transf ult. ano	1,50 (2,12)	1,43 (4,03)	0,439
Total transf	15,89 (20,25) / 9	7,10 (7,39)/28	0,216
Hb (g/dL)	7,88 (0,64)	8,11 (0,96)	0,482
HbF (%)	6,10 (4,60) / 8	7,87 (6,36) / 21	0,483
Leucócitos (x10 ³ /L)	12386 (2869)	12357 (4096)	0,984
Plaquetas (x10 ³ /L)	496,3 (79,47)	446,2 (137,51)	0,284
Reticulócitos (%)	8,12 (4,94) / 9	7,58 (5,20)	0,640
LDH (U/L)	1223,60 (511) / 9	1190,4 (594,5) / 29	0,876
PCR- as (mg/L)** +	1,46 (0,78-2,17)	2,64(0,95-3,65)	0,757
HDL-c (mg/dl)	31,44 (6,09)	34,69 (8,42)	0,268
VF ACM dir (cm/s)	131,9 (48,5)	157,3 (160,9)	0,630
VF ACM esq. (cm/s)	189,0 (227,9)	166,9 (175,3)	0,508
Escore Z IMC	-1,11(0,87)	-1,04 (0,89) / 29	0,875
SpO ₂ (%)	95,4 (2,71)	95,07 (3,07)	0,767
PAS (mmHg)	94,44 (10,44) / 9	99,54 (10,71) / 26	0,225
PAD (mmHg)	57,56 (9,61) / 9	58,52 (10,05) / 25	0,805

N* expresso quando o número de participantes for diferente de 10 e 30, em pelo menos um dos grupos. ** mediana (p25 –p75); + Mann Whitney. CVO crise vasclusiva. LDH (Lactato desidrogenase); PCR as (proteína C reativa de alta sensibilidade); VF ACM, (velocidade de fluxo em artéria carótida média); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica).

Comparando-se médias da VMF entre pacientes com Doppler transcraniano (DTC) normal n=32 (10,64%); condicional n=5 (12,05%); anormal n=1(5,04%) e assimétrico n=2(5,09%) não foi observado diferença significativa entre os grupos, (p = 0,405).

As correlações entre VMF de indivíduos HbSS e variáveis clínicas e laboratoriais, demonstrou uma associação negativa com nº de STA no último ano.

$r^s = -0,343$ $p = 0,030$ (**Tabela 8 e Gráfico 3**).

Tabela 8 – Correlações entre VMF e variáveis clínicas e laboratoriais envolvendo 40 indivíduos com anemia falciforme

Variáveis	VMF r^s	Valor de p
No crises VO	-0,061	0,707
No vezes emerg ano	-0,184	0,257
No intern. ult. ano	-0,128	0,438
Tempo intern. STA	-0,026	0,871
Idade do priapismo	-0,276	0,085
No STA ult. ano	-0,343	0,030
No transf ult. ano	-0,54	0,739
Total transf	-0,229	0,160
Hb (g/dL)	0,109	0,503
HbF (%)	0,084	0,663
Leucócitos ($\times 10^3/L$)	-0,069	0,674
Plaquetas ($\times 10^3/L$)	-0,002	0,992
Reticulócitos (%)	0,113	0,493
LDH (U/L)	-0,090	0,586
Colesterol total (mg/dL)	0,164	0,312
LDL-c (mg/dL)	0,034	0,837
HDL-c (mg/dL)	0,207	0,201
Triglicérides (mg/dL)	-0,031	0,853
PCR-as (mg/L)	0,185	0,260
VF ACM dir (cm/s)	-0,006	0,972
VF ACM esq. (cm/s)	0,091	0,576
Escore Z IMC/i	0,048	0,771

r^s (correlação de Spearman). CVO crise vasclusiva. HbF (hemoglobina fetal); LDH (Lactato desidrogenase); PCR as (proteína C reativa de alta sensibilidade); VF ACM, (velocidade de fluxo em artéria carótida média); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica).

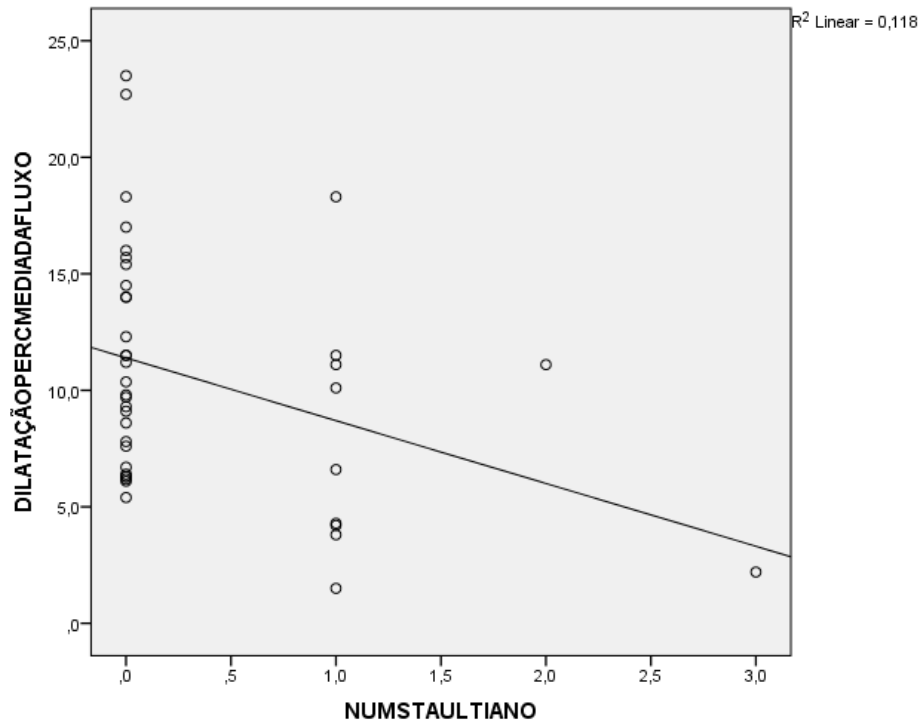


Gráfico 3. Correlação entre VMF e nº de episódios de STA no último ano

A análise de regressão linear multivariada para fatores associados à dilatação média, tomando dilatação como variável dependente e considerando o tamanho amostral limitante m 40, permitiu a inclusão de 4 variáveis. As variáveis incluídas foram: número de episódios de STA no último ano, número total de transfusões, idade em que ocorreu priapismo, HDL-c.

O modelo final mostrou $p < 0,051$ ao teste ANOVA F-Test e coeficiente beta ajustado para número de Síndrome torácica aguda - 2,4% o que significa que para cada novo episódio de STA há uma diminuição da VMF em 2,4%

Tabela 9 – Análise de regressão linear para verificar fatores independentemente correlacionados à vasodilatação mediada por fluxo

Variável independente	Coefficiente de regressão parcial padronizado (Beta)	Coefficiente não-padronizado (B)	Erro padrão	IC 95%	Valor p
Número de episódios de STA	-0,315	-2,407	1,191	-4,821 – 0,006	0,051
(Constante)	-	11,480	0,874	9,709 – 13,251	$p < 0,001$

STA (Síndrome Torácica Aguda).

7. DISCUSSÃO

A Doença Falciforme tem sido cada vez mais compreendida como uma doença vascular na qual se associam fatores genéticos, ambientais e biológicos, ativando o endotélio e comprometendo órgãos e sistemas. Algumas manifestações relacionadas à agressão vascular como HP, STA, AVE, número de CVO têm sido associadas a maior mortalidade, maior número de internamentos e comprometimento da qualidade de vida. A alteração da função endotelial provavelmente é um dos mecanismos iniciais destas complicações.

Poucos trabalhos foram realizados demonstrando disfunção endotelial em crianças e adolescentes com AF através da avaliação da VMF. Montalembert *et al*²² comparou a VMF de 21 crianças com AF em estado estacionário de doença e 23 controles afro-caribenhos, assintomáticas, sem antecedentes de AVE, encontrando média e DP (5.6 ± 0.2 vs $8.0 \pm 0.2\%$, $p=0.008$) respectivamente. Hadeed *et al*¹¹⁷ comparou 30 crianças com AF em estado assintomático e 30 crianças saudáveis, média de idade $11,4 \pm 2,3$ vs $12,4 \pm 3,5$ e não encontrou diferença significativa da média da VMF entre estes grupos ($8,2 \pm 5\%$ vs $9,3 \pm 4,2\%$ $p = 0,15$). Hadeded argumenta que a sua população de estudo não apresentava doença tão grave com prevalência de apenas 16,6% de CVO e que provavelmente a VMF estaria mais baixa em pacientes mais graves.

No nosso conhecimento estes são os únicos trabalhos publicados avaliando disfunção endotelial em crianças com AF através da vasodilatação mediada por fluxo, bem como a inexistência de trabalhos que compare a VMF (vasodilatação mediada por fluxo) de pacientes HbSS em uso e não uso de hidroxiuréia.

Neste estudo a VMF foi significativamente menor em crianças e adolescentes com AF em estado estacionário de doença (média \pm DP $10\% \pm 5\%$ vs $18,45 \pm 9\%$, $p < 0,001$) quando comparadas a grupo de indivíduos saudáveis com faixa etária semelhante, demonstrando assim uma menor capacidade de vasodilatação decorrente do comprometimento da função endotelial. Esse dado é relevante na medida em que demonstra que a agressão vascular na AF é muito precoce. Já está demonstrado que em indivíduos com AF não só fenômenos trombóticos produzidos por aglomerados heterocelulares de hemácias polimerizadas, leucócitos e plaquetas, participam das lesões vasculares, mas também a liberação de hemoglobina livre,

através da hemólise, levando ao aumento do consumo e diminuição da produção do NO, mecanismo diretamente ligado à alteração da função endotelial.^{12, 13} Os dados deste estudo também são reforçados por pesquisas com resultados semelhantes. Zawar *et al*²³ demonstraram uma pior função endotelial, avaliada através do uso de Doppler da artéria braquial em pacientes adultos com AF. Belhanssen *et al*²⁴ avaliando 16 indivíduos com AF (idade média $29 \pm 1,7$ anos) e 15 controles encontrou VMF de ($1.73\% \pm 0.44\%$ vs $3.97\% \pm 0.24\%$, $P < 001$) respectivamente. Os valores mais baixos da VMF nos estudos acima podem estar relacionados à faixa etária estudada, visto que a vasodilatação endotélio-dependente tende a diminuir com a idade¹⁶.

No que se refere ao uso de hidroxiureia, cujo uso é indicado em pacientes mais graves, não foi observada diferença da VMF de pacientes em uso e em não uso de hidroxiuréia, como também não houve diferença no percentual de disfunção endotelial entre estes grupos. Considerando que esta droga produz benefícios na AF, aumentando a concentração da HbF e que outros efeitos também foram observados como alteração da expressão de moléculas de adesão⁹⁰ e aumento na produção do óxido nítrico,⁹¹ é possível que a HDX tenha melhorado a função endotelial do grupo potencialmente mais grave, igualando-a ao subgrupo que não usava esta medicação.

Olnes *et al*,¹¹⁸ descreveram em 5 pacientes com elevação da pressão sistólica da artéria pulmonar e elevação de indicadores de hemólise, decréscimo da velocidade de regurgitação mitral após tratamento com HDX, concluindo assim que a HDX pode reduzir a gravidade de hemólise associada à disfunção endotelial e hipertensão pulmonar em pacientes com AF.

Utilizando-se como valor de corte para disfunção endotelial o percentil 10 das crianças saudáveis, conforme referências de Jarvisalo *et al*^{102 119} e Andrade *et al*,¹⁰³ o valor da VMF encontrado foi 8,4%. Comparando-se médias e medianas das variáveis clínicas e laboratoriais de indivíduos HbSS com e sem disfunção endotelial, não foi encontrado diferença significativa entre os grupos. Ao ser comparado grupos com valor de corte de VMF no percentil 25 ($n = 10 < 6,3\%$ e $n = 30 \geq 6,3\%$) foi encontrado diferença significativa em relação a número de internamentos por CVO no último ano e tendência à diferença significativa em relação a número de CVO no último ano e número de STA no último ano. Isto leva à suposição de que valores de

VMF abaixo do percentil 25 se associam a manifestações clínicas mais graves da AF, sugerindo que quanto menor a VMF maior a agressão vascular.

A VMF apresentou correlação negativa com número de STA no último ano ($r^s = -0,343$; $p=0,030$). Dois a mais episódios de STA no ano é critério para introdução de HDX, sendo um critério de gravidade.^{93 109} É possível que este achado esteja relacionado ao problema das múltiplas comparações. Além disso, esta variável foi coletada a partir de informações obtidas do prontuário e da entrevista com o responsável da criança ou adolescente. Na STA, além de fenômenos vasoclusivos, trombóticos e inflamatórios, ocorre lesão endotelial e hemólise.¹⁰⁶ Observa-se aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição da biodisponibilidade do NO.^{29,106, 123} Deficiência de NO¹²⁰ contribui para o estado de vasoconstrição do falcêmico o que aumenta a aderência de hemácias em foice ao endotélio, contribui para o processo vasoclusivo e piora a hipóxia na microvasculatura pulmonar, num processo de retroalimentação positiva o que permite hipotetizar que exista uma relação entre estas variáveis. Na análise multivariada, o número de Síndrome torácica aguda aponta como fator independente associado à maior agressão vascular e pode ser de certa forma quantificada, uma vez que cada novo episódio de STA implica em uma redução em 2,4% da capacidade de dilatação do vaso durante o teste de hiperemia reativa. Embora modelos de estudo de corte transversal não permitam estabelecer uma relação de causa-efeito, os dados acima e os mecanismos implicados na fisiopatologia da STA permitem hipotetizar que exista uma relação de causalidade e que o endotélio agredido favoreça ao desenvolvimento de complicações. Vale ressaltar que STA é a segunda causa de internamento em maiores de 2 anos de idade, principal causa de internamento em UTI e principal causa de mortalidade em indivíduos com Anemia Falciforme.

AF é uma doença que apesar de ser causada por mutações idênticas em um único gene pode ter curso clínico muito diversificado. Os fenótipos da doença da célula falciforme são susceptíveis de serem modulados por polimorfismos em genes que estão envolvidos na inflamação, interação célula-célula e biologia do óxido nítrico. A interação de redes de genes e fatores ambientais influenciam os muitos subfenótipos da anemia falciforme^{121 122} através da ativação ou inibição da expressão de genes. A produção de HbF, a produção de bilirrubinas, a resposta a hidroxiuréia, a predominância de hemólise, episódios dolorosos, AVE, STA¹²² são

definidas por genes que interagem entre si e com fatores ambientais como estado nutricional, condições socioeconômicas, acesso aos serviços de saúde, vacinação, controle de infecções, comorbidades como Asma e outros. É possível que este modelo heterogêneo justifique a ausência de associações fortes e estaticamente significativas entre a VMF e variáveis clínicas e laboratoriais. É possível ainda que por se tratar de criança, apenas as manifestações clínicas que envolvam as alterações vasculares se relacionem com comprometimento da função do endotélio, fase inicial das futuras lesões estruturais que poderão estar presentes na vida adulta.

8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo, no nosso conhecimento, foi o terceiro que avaliou disfunção endotelial em crianças e adolescentes com AF através da vasodilatação mediada por fluxo, valendo ressaltar que com tamanho amostral superior aos dois trabalhos publicados^{22 117} e com critérios de inclusão e exclusão rigorosos no que se refere às variáveis de confusão para função endotelial. Assim como nos estudos anteriores, a função endotelial foi avaliada através de uma técnica de imagem, cuja principal limitação, é ser dependente da habilidade do operador, entretanto trabalhos demonstraram que esta técnica produz resultados precisos e reprodutíveis, além de ser segura e acessível¹¹⁹. A falta de consenso à cerca dos valores que representam maior agressão vascular, sobretudo em crianças e adolescentes, implica na determinação destes valores comparando a VMF de pacientes com indivíduos saudáveis. Neste estudo não foi conseguido pareamento por sexo entre os grupos, porém não houve diferença significativa da VMF entre os sexos masculino e feminino, como também não houve diferença significativa entre indivíduos com escore $z \leq +1$ e $> +1$ do IMC. Embora metodologias de corte transversal não permitam definir prognóstico, e não tenham sido encontradas associações entre a VMF e manifestações clínicas e laboratoriais na AF, o fato de pacientes com VMF abaixo do percentil 25 apresentarem algumas manifestações de maior gravidade, sugere que a função endotelial possa ser um indicador de agressão vascular e associar-se a futuras lesões limitadoras (retinianas, neurológicas, renais, hipertensão pulmonar). Nesse sentido, vale chamar atenção que estes desfechos poderão ser observados nesta população em estudo prospectivo e o valor preditivo da VMF, para risco de complicações, estabelecido. É possível ainda reavaliar a função endotelial destes pacientes em intervalos de tempo a ser definido em estudo longitudinal, observando a evolução deste indicador, na predição de desfechos clínicos e laboratoriais, bem como observar o impacto do tratamento da HDX sobre esse indicador de agressão vascular. Um estudo com maior tamanho amostral talvez ajude na estratificação de risco para lesão vascular a partir da resposta vasodilatadora dependente do endotélio tomando como desfechos AVE, hipertensão pulmonar, osteonecrose, alterações renais e retinianas.

9. CONCLUSÕES

- 1) Crianças e adolescentes com anemia falciforme apresentam comprometimento da função endotelial com menor capacidade de vasodilatação que indivíduos saudáveis da mesma faixa etária.
- 2) Disfunção endotelial é um processo precoce que ocorre em crianças e adolescentes HbSS em estado estacionário da doença. Valores da VMF abaixo do percentil 25 dos indivíduos HbSS provavelmente começam a se associar a manifestações clínicas e laboratoriais.
- 3) Pacientes em uso de HDX, ainda que considerados mais graves, apresentaram função endotelial semelhante aos que não utilizaram esta medicação, o que pode sugerir melhora da agressão vascular após introdução da droga.

REFERÊNCIAS

- 1 Brasil. Ministério da Saúde. Hemoglobinopatias: Doença falciforme. Brasília, [2007]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27777&janela=1>. Acesso em: 12 maio 2015.
- 2 Wang WC. Sickle cell anemia and other syndromes. In: Greer John P. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia. Williams and Wilkins. 13^a ed.1999: 1346-97.
- 3 Brasil. Ministério da Saúde. Perfil demográfico da doença falciforme. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/biblioteca>. Acesso em: 15 março 2015,
- 4 Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. Trends Pharmacology Sci. 2006; 27:204-10.
- 5 Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. Lancet. 2004; 364:1343-60.
- 6 Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. Br J Haematol. 2005; 129:465-81.
- 7 Serjeant GR. Sickle cell diseases. New York. 2^a Ed. Oxford University Press; 1992. p. 631-4
- 8 Kaul DK, Nagel RL. Sickle cell vasoocclusion: many issues and some answers. Experientia. 1993; 49:5-15
- 9 Kassim AA, De Baun M. Sickle cell disease, vasculopathy, and therapeutics. Annu Rev Med. 2013; 64: 451-66. doi: 10, 1146 / annurev-med-120611-143127. Epub 2012 novembro 26. Review. PMID: 23190149.
- 10 Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. 2002; 8: 1383–89. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426562>. Acesso em: 25 de maio 2015.
- 11 Gladwin MT. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116:2330-2332.
- 12 Gladwin MT. et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:886-95.
- 13 Kato JG, Gladwin TM, and Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007 Jan; 21(1): 37-47.
- 14 Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373-376.

- 15 Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003; 108(17):2054-9.
- 16 Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation A Diagnostic Instrument or an Experimental Tool? *Chest*. 2005; 127:2254-2263
- 17 Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002; 106:640–642
- 18 Anderson TJ, Elstein E, Haber H, Charbonneau F. Comparative study of ACE inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study). *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35:60-6.
- 19 Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:257-65.
- 20 Ladeia AM, Ladeia-Frota C, Pinho L, Stefanelli E, and Adan L. Endothelial dysfunction is correlated with microalbuminuria in children with short-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28(8):2048-50.
- 21 Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340:1111-5
- 22 Montalembert M, Aggoun Y, Niakate A, Szezepanski I, Bonnet D. Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease. *Haematologica*. 2007; 92:1709-10.
- 23 Zawar S, Vyawahare M, Nerkar M et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in sickle cell disease by Doppler ultrasonography. *Journal of Association of Physicians of India*. 2005 ; 53: 677-680
- 24 Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, et al. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood*. 2001 15; 97(6):1584-9.
- 25 Steinberg MH, Embury SH. α -thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*. 1986; 68:985-90.
- 26 Adekile AD, Huisman THJ. HbF in sickle cell anemia. *Experientia*.1993;49:16-27.
- 27 Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Ver*. 2006; 8:1-23.

- 28 Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. *Blood Rev.* 2004; 18:65-73.
- 29 O’Driscoll S, Height SE, Dick MC. and Rees DC. Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. *British journal of hematology.* 2008; 140: 206-9
- 30 Kato GJ, McGowan VR, Machado RF, Little JA, Taylor VJ, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension and death in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2006; 107:2279-85.
- 31 Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; 325:11-6.
- 32 Field JJ, Macklin EA, Yan Y, Strunk RC, DeBaun MR. Sibling history of asthma is a risk factor for pain in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2008; 83:855-7.
- 33 Hargrave DR, Wade A, Evans JP, Hewes DK, Kirkham FJ. Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children. *Blood.* 2003; 101:846-8.
- 34 Herrick, JB. Glóbulos vermelhos peculiares alongados e em forma de foice em um caso de anemia grave. *Arch Int Med.* 1910; 20:586-98.
- 35 Africanus Horton JB. *The Diseases of Tropical Climates and Their Treatment.* London: Churchill; 1874.
- 36 Wang WC . Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: JP Greer, Wintrobe's *Clinical Hematology.* 12^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009. p.1038-82.
- 37 Coutinho E. Diagnóstico de anemias. *A Folha Médica.* Rio de Janeiro. 1933; 14: 447-50
- 38 Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science.* 1949; 110: 543-4.
- 39 Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell Disease. *Lancet.* 2010; 376:2018-31.
- 40 Galiza Neto GC, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da Anemia Falciforme. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* Rio de Janeiro. 2003; 39(1).
- 41 Garnier M, Delamare J, Delamare V, Delamare T. *Dicionário Andrei de Termos de Medicina.* 2 ed., São Paulo: Andrei Editora Ltda.; 2002.
- 42 Bunn HF, Forget BG. *Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects.* W.B. Saunders Company; 1986.

- 43 Gonçalves MS. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme. *Revista Baiana de Pediatria*. 2011; 5(1).
- 44 Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. - Manual de Conduas Básicas na Doença Falciforme Série A. Normas e Manuais Técnicos Brasília – DF 2006. Acesso em: 9 março 2015
- 45 Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg MD et al. Sickle Cell Disease; Pathophysiology HbS mutation – origins. In: Nathan and Oski's - Hematology of Infancy and Childhood. 7^a Ed. Philadelphia. Saunders Elsevier. 2009; 19:950
- 46 Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematology/Oncology. Clinics of North America*. 1996; 10(6).
- 47 Zago MA, Pinto ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2007; 29(3):207-14.
- 48 Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle cell erythrocytes with endothelium. *The American Society for Clinical Investigation*.1997; 99(11):2561-4.
- 49 Fabry ME, Kaul DK. Sickle cell vaso-occlusion. In: Nagel RL, eds. *Hematology/Oncology Clinics of North America - Hemoglobinopathies*. 1991; 5(3): 375-98.
- 50 Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of Hematology. In: Tietz NW. *Fundamentals of clinical chemistry*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1987, 2(, 24).
- 51 Solovey AA, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*. 2001; 97(7)1937-41.
- 52 Smith Jr SR, Anderson JL, Cannon RD, Fadl YY, Koenig W, Libby P, et al. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the clinical practice discussion group. *Circulation*. 2004; 110:550-3.
- 53 Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*. 1988; 37:2495-501.
- 54 Morris CR. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematology Educ Program* 2008; 177-85.
- 55 Morris CR. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. *Haematologica*. 2011; 96:1-5.
- 56 Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*. 2008 15;44(8):1506-28.

- 57 Dalsgaard T, Simonsen U, Fago A. Nitrite-dependent vasodilation is facilitated by hypoxia and is independent of known NO-generating nitrite reductase activities. *Am. J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292:3072-8.
- 58 Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 2254-2265)
- 59 Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: an overview of molecular etiology, pathophysiology and therapeutic approaches. *Scientific World Journal* . 2008; 8:1295-324.
- 60 Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal.* 2009 ; 18;9:46-67 .
- 61 Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood.* 1995; 86(2):776-83.
- 62 Airede AI. Acute splenic sequestration in a five-week-old infant with sickle cell disease. *J Pediatr.* 1992;120(1):160.
- 63 Topley JM, Rogers DW, Stevens MCG, Serjeant GR. Acute splenic sequestration and hypersplenism in the first five years in homozygous sickle cell disease. *Archives of Disease in Childhood.* 1981; 56 (10): 765-769
- 64 Powell RW, Levine GL, Yang YM, Mankad VN. Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: early detection and treatment. *J Pediatr Surg.* 1992; 27 (2): 215-219
- 65 Seeler RA, Shwiaki MZ. Acute splenic sequestration crises (ASSC) in young children with sickle cell anemia. Clinical observations in 20 episodes in 14 children. *Clin Pediatr (Phila).* 1972; 11: 701-4.
- 66 Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR. The causes of death in sickle cell disease in Jamaica. *British Medical Journal.* 1982; 285 (6342): 633-635
- 67 Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2000; 342:1855-65
- 68 Charache S, Scott JC, Charache P. Acute Chest Syndrome' in Adults With Sickle Cell Anemia: Microbiology, Treatment, and Prevention. *Archives of Internal Medicine.* 1979; 139 (1): 67-69.
- 69 Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. *Blood.* 1997;89:1787-92.

- 70 Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF *et al.* Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. *The Scientific World Journal*. 2012; pp.1-55
- 71 Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, *et col* and The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *Blood*. 1994; 84 (2) : 643-649
- 72 Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN *et al.* Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*. 2000 vol. 342, no. 25, pp. 1855–1865.
- 73 Bernadine F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, *et al.* G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2009; 114:742-3.
- 74 Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol*. 2006; 5:501-12.
- 75 Prohovnik I, Hurllet-Jensen A, Adams R, Vivo D, Pavlakis SG. Hemodynamic etiology of elevated flow velocity and stroke in sickle-cell disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009; 29:803-10.
- 76 Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, *et al.* Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998; 91:288-94.
- 77 Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, *et al.* Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 2011. 27; 117(4).
- 78 Pegelow CH, Macklin EA, Moser FG, Wang WC, Bello JA, Miller ST, *et al.* Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood*. 2002 Apr 15; 99(8).
- 79 Schatz J, Brown RT, Pascual JM, Hsu L, DeBaun MR. Poor school and cognitive functioning with silent cerebral infarcts and sickle cell disease. *Neurology*. 2001. 24; 56(8).
- 80 Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, *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*. 1998. 2; 339(1):5
- 81 Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S. *AHA/ASA Guideline: guidelines for the primary prevention of stroke*. *Stroke*. 2011. 42(2):517.

- 82 Castro LM, Jonassaint JC, Graham FL, Ashley-Koch A, Telen MJ. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical and laboratory endpoints and disease outcomes. *Am J Hematol.* 2008; 83:19-25.
- 83 Ataga KI, Moore CG, Jones S, Olajide O, Strayhorn D, Hinderliter A, et al. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study. *Br J Haematol.* 2006; 134:109-15.
- 84 Bachir D, Parent F, Hajji L, Inamo J, Loko G, Lionnet F, et al. Prospective multicentric survey on pulmonary hypertension (PH) in adults with sickle cell disease. *Blood.* 2009; 114:572.
- 85 Rogers ZR. Priapism in sickle cell disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 2005; 19 (5): 917–928.
- 86 Gradisek RE. Priapism in sickle cell disease. *Annals of Emergency Medicine.* 1983;12 (8):510–512.
- 87 Baron M, Leiter E. The management of priapism in sickle cell anemia. *Journal of Urology.* 1978;119(5) : 610–611
- 88 Kato G. J. Priapism in sickle-cell disease: a hematologist's Perspective. *Journal of Sexual Medicine.* 2012; 9(1): 70– 78.
- 89 Bunn H F, Nathan DG, Dover G J. et al. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood.* 2010; 116(5): 687–692.
- 90 Cartron J-P, Elion J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. *Transfus Clin Biol.* 2008; 15:39-50.
- 91 Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. *Exp Biol Med.* 2009; 234:1374-82.
- 92 Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1995; 332:1317-22.
- 93 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Doença Falciforme. 2002. Disponível em: <http://abhheventos.com.br/pediatria2013/wp-content/uploads/2013/08/portaria55.pdf>. Acesso em: 14 dezembro 2014.
- 94 Steinberg MH. Management of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine.* 1999; 340(13):1021-30..
- 95 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362:801-9.

- 96 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115:1285-95.
- 97 Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995; 91:1314-9.
- 98 Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1–H5
- 99 Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334:150–154
- 100 Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, et al. Endothelium dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation* 1997; 96:3378–3383
- 101 Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74:247–253
- 102 Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, et al. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H87–H92
- 103 Andrade ZM, Carvalhaes JTA, Taddei JAAC, Christofalo DMJ, Ajzen SA. Endothelial function of normotensive adolescents with no risk factors for arterial hypertension. *Jornal de Pediatria*. 2005; 81(5):395-9
- 104 Adams R, Mckie V, Nichols F, Carl E. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med*. 1992;326(9):6.
- 105 Wang W C, Ware R E, Miller, ST. *et al*. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomized, controlled trial (BABY HUG). *The Lancet*. 2011; 377 (1663-1672)
- 106 Heeney M. Mahoney D. The acute chest syndrome in children and adolescents with sickle cell disease. In UpToDate, 2014. Disponível em <http://www.uptodate.com>. Acesso em: 06 novembro 2014
- 107 Hammerman, S.I; Farber, H.W. Pulmonary complications of sickle cell disease. In UpToDate, 2012. Disponível em <http://www.uptodate.com>. Acesso em: 15 maio 2013
- 108 Mafra AA, Silva ME, Martins P. Protocolos de Atenção à Saúde – Anemia Falciforme. Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte. Fundação Hemominas Gerência de Urgência.

109 Cançado, R DL, Ângulo C, Araújo LI, et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009; 31: 361-366

110 Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq. Bras. Cardiol. São Paulo. 2013; 101(4), supl.1.

111 World Health Organization. Child growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Disponível em: http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/en/ Acesso em: 15 outubro 2014

112 Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq. Bras Cardiol 2010; 95(1 supl.1): 1-51

113 Sampaio RR, Ladeia AM, Meneses RB *et al.* C-reactive protein does not correlate with endothelial dysfunction in women with overweight and obese. J Clin Med Res. 2013 ; 5(4):294-9.

114 Ladeia AM , Sampaio RR , Hita MC and Adan LF. Prognostic value of endothelial dysfunction in diabetes mellitus type 1. World J Diabetes. 2014;5(5):601-5.

115 Costa KCM, Lima JC, Almeida AC *et al.* Variation of the brachial artery diameter in obese children: present and future. Revista Paulista de Pediatria. 2012; 30 (3): 431-437

116 Hosmer Jr DW, Lemeshow S. Applied logistic regression. 2^a ed. Wiley-Interscience Publication; 2000.

117 Hadeed K, Hascoet S, Castex M-P. Endothelial Function and Vascular Properties in Children with Sickle Cell Disease. Wiley Periodicals, Inc. Echocardiography. 2014.

118 Olnes M, Chi A, Haney C, *et al.* Improvement in hemolysis and pulmonary arterial systolic pressure in adult patients with sickle cell disease during treatment with hydroxyurea. Am J Hematol. 2009; 84(8): 530–532.

119 Järvisalo JM, Raitakari OT. Ultrasound assessment of endothelial function in children. Vascular Health and Risk Management. 2005;1(3): 227–233.

120 El-Ghamrawy MK, Hanna WM, Abdel-Salam A *et al.* Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study. J Pediatr (Rio J). 2014; 90(3):286-292

121 Steinberg MH, Adewoye AH. Modifiers genes and sickle cell anemia. Curr Opin Hematol. 2006;13:131-6.

122 Steinberg M H., Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*. 2012; 87 (8): 795–803.

123 Gualandro S.F.M., Fonseca G.H.H., Gualandro D.M. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007; 29(3): 291-298

ANEXOS

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO PADRÃO

Nº DO PRONTUÁRIO _____

Nome _____

Data de nascimento _____ Sexo _____

Responsável _____

Endereço _____

Telefones _____

Naturalidade _____ Procedência _____

Data _____ Instituição _____

Teste do Pezinho _____ Eletroforese de HB _____

Início do acompanhamento com especialista _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS E DADOS VITAIS

Peso _____ Altura _____ IMC _____ escore Z _____ Classificação _____

Estágio de Tanner _____ Menarca _____

SAT _____ PA _____ FC _____ FR _____ Circunf. Abdom _____

CRISES ÁLGICAS (no último ano - anterior à data atual)

1. Último episódio de crise álgica _____
2. Tratamento utilizado _____
3. Número de crises no último ano _____
4. Uso de opióide sim _____ não _____
5. Atendimento em emergência sim _____ não _____ Número de vezes _____
6. Internamento sim _____ não _____ Número de vezes _____
7. Incapacidade para realização das atividades _____

SÍNDROME TORÁCICA AGUDA (RX com infiltrado novo e sinais ou sintomas respiratórios)

1. Último episódio _____
2. Tempo de internamento _____
3. Uso de oxigênio sim _____ não _____
4. Necessidade de Transfusão sanguínea sim _____ não _____
5. Número de crises no último ano _____

OSTEOMIELITE Sim _____ Não _____ Idade _____

TRANFUSÕES SANGUÍNEAS

1. Sim _____ Não _____ Último episódio _____
2. Número de transfusões (no último ano) _____
3. Reações transfusionais sim _____ não _____

4. Total de transfusões até o momento _____

PRIAPISMO Sim _____ Não _____

SEQUESTRO ESPLENICO Sim _____ Não _____ Idade _____

ESPLENECTOMIA Sim _____ Não _____ Idade _____

Dispneia aos esforços sim ___ não ___ Habituais _____ Não Habituais _____

1. Síncope sim _____ não _____

2. Enurese sim _____ não _____

DADOS LABORATORIAIS (Colocar valores de referência e data)

HB _____ HTC _____ Eritrócitos _____

VGM _____ CHCM _____ RDW _____

Global de leucócitos _____ (%)N ou SEG _____ BASO _____

BT _____ EO _____ L _____ L ATÍPICOS _____ Monócitos _____

Plaquetas _____ (Data _____)

RET _____ LDH _____ Colest Total _____ TGC _____

LDL _____ HDL _____ VLDL _____ TGO _____ TGP _____

BBT _____ BD _____ BI _____ PCR _____ GLICEMIA _____

DOPPLER TRANSCRANIANO _____

Data da realização _____

MEDICAMENTOS

Usa Hidroxiuréia sim _____ não _____ Há quanto tempo? _____

Uso de antibiótico nos últimos três meses sim ___ não ___ Quais _____

LISTA DE PROBLEMAS (Colelitíase, nefropatia, alterações oftálmicas, asma, rinite alérgica etc).

O QUE PREDOMINA EM SEU QUADRO CLINICO? (CRISE VASOCLUSIVA, INFECÇÕES, PNEUMONIAS ETC).

(responsável pela coleta de dados)

(Supervisor)

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho _____ está sendo convidado a participar da pesquisa **“Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia Falciforme”**. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar se esta população apresenta mais dificuldades para respirar à noite, problemas nos pulmões que favorecerão a dificuldades respiratórias na vida adulta, inflamação nos vasos sanguíneos, problemas no coração. Para isso precisamos comparar com outras crianças e adolescentes sem Anemia Falciforme. Esta pesquisa conta com a participação de Dra. Ana Marice Ladeia, coordenadora da pesquisa e cardiologista, Dra. Regina Terse Ramos, pneumologista pediátrica, Dra. Rozana Teixeira, pediatra e pesquisadora assistente, Dra. Cristina, Otorrinolaringologista e Dra. Isabel Guimarães, cardiologista pediátrica.

Seu filho realizará as seguintes avaliações: Peso, altura, medida da pressão arterial e medida na oxigenação do sangue através de um sensor colocado do dedo da mão ou do pé que fará a leitura do oxigênio no sangue que será feita no dia do atendimento do seu ambulatório. Neste dia responderá a um questionário sobre identificação (idade, local de nascimento), se tem tido crises de dor, se tomou muitas transfusões. **Posteriormente será realizado um questionário que permitirá compreender melhor o ritmo sono-vigília de sua criança e avaliar se existem problemas para iniciar o sono, se tem medo, pesadelos, se ronca, se para de respirar enquanto dorme e como é o comportamento do seu filho no dia a dia.** Fará uma avaliação com Otorrinolaringologista para ver se apresenta adenoide (carne no nariz), e outras deformações no nariz que possam dificultar a respiração.

Fará um exame chamado espirometria, onde soprará em um aparelho com bocal descartável. Este aparelho vai medir a força com que ele respira e se apresenta estreitamentos nos brônquios ou problemas nos pulmões. Durante o exame será dado um remédio inalatório “bombinha” que dilata o brônquio e avalia se melhora o desempenho depois deste remédio, pois algumas crianças podem ter Asma e não saber. Este remédio poderá aumentar um pouco a frequência do coração, mas costuma ser bem tolerado e esse efeito passa rapidamente. Para estudar se os vasos estão sem dilatar quando o organismo precisa, fará um exame onde precisará de 4 horas de jejum. Será colocado no braço um aparelho de medir

pressão que será insuflado por 3 a 4 minutos e depois de esvaziado, o fluxo de sangue na artéria do braço será medido com ultrassom. Esse exame não causa dor e pode causar uma leve sensação de formigamento enquanto o aparelho de pressão estiver preso no braço. Realizará um Ecocardiógrafo, que também é um exame de ultrassom para verificar o tamanho do coração e se ele está funcionando normalmente. A polissonografia, estudo do sono, será realizada em um laboratório da Universidade Federal da Bahia. A criança e o adolescente dormirão lá com seu acompanhante e um técnico, sob condições de segurança e ambiente semelhante ao seu domicílio. Neste momento responderá a algumas perguntas sobre o sono e respiração. Em nenhuma destas etapas serão utilizados sedativos. Serão coletados exames de sangue em amostra única, que precisarão de 12 horas de jejum. Serão hemograma, colesterol e triglicérides (gordura do sangue), exames que avaliam inflamação no sangue, no fígado e a taxa de renovação das células vermelhas do sangue.

Todos estes exames não terão nenhum custo para as crianças participantes e será fornecido lanche para crianças após os exames que exijam jejum superior a quatro horas.

Estamos oferecendo ao seu filho (a) uma avaliação ampla de saúde, cujos resultados estarão disponíveis e além disso estarão ajudando outras crianças a se beneficiarem de medidas futuras que esta pesquisa poderá esclarecer. Esclarecemos ainda que os responsáveis receberão cópias dos laudos de todos os exames realizados durante a pesquisa, bem como que terão assistência médica gratuita em caso de se identificar alguma patologia durante a realização desses exames.

Diante então do exposto acima, autorizo a participação do mesmo nesta pesquisa médica, ciente de que não trará malefícios para sua saúde. Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e retirar o paciente do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, o paciente poderá ser solicitado a realizar exames, caso o médico que o assiste, julgue-os necessários para a sua saúde e bem estar. Minha recusa em permitir que meu filho ou tutelado participe do estudo não resultará em punições ou perda de benefícios a que ele/ela tenha direito.

Esclarecemos ainda que o Sr (a) assinará duas cópias deste documento, uma delas devendo ficar em seu poder para esclarecimentos em qualquer momento

que julgar necessário e a outra fará parte do arquivo de protocolos e documentos da pesquisa.

Assinatura do responsável pelo paciente

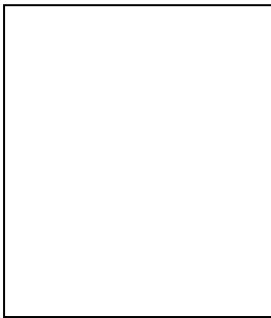
Endereço: _____

Número de identidade: _____.

Número no estudo: _____.

Salvador-BA, _____ / _____ / _____.

Paciente (menor de idade)



Impressão

Assinatura do Pesquisador Assistente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para maiores esclarecimentos e/ou dúvidas durante a pesquisa o senhor poderá entrar em contato com a Pesquisadora Assistente: Dra. Rozana dos Santos Teixeira, telefone (71)9204-4844 residente na Avenida Orlando Gomes, Village Piatã, Rua C, casa 12, Bairro Piatã. Salvador-BA ou Dra. Ana Marice Ladeia, telefone (071) 99642420 ou (071) 32768265, na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, na Avenida Dom João VI, nº 275, Brotas. CEP 40.290-000.

Em caso de dúvida ou denúncia o Sr (a) poderá procurar o Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, na Rua Frei Henrique nº 8, Nazaré. CEP 40.050- 420. Fone: (71) 2101-2944 / e-mail: cep@bahiana.edu.br

ANEXO 3 - TERMO DE ANUÊNCIA DA EBMSP

BAHIANA
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

www.bahiana.edu.br

Salvador, 22 de julho de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

O Ambulatório Docente-Assistencial de Brotas (ADAB) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, sob o CNPJ 13.927.934.0001-15 concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto.



Prof^a Dr^a. Eliana de Paula

Coordenadora do Ambulatório Docente-Assistencial de Brotas (ADAB)
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

ANEXO 4 - TERMO DE ANUÊNCIA DO HOSPITAL ROBERTO SANTOS

Salvador, 22 de julho de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

O Hospital Geral Roberto Santos concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto.


Prof. Dr. Marcos Antônio Almeida Matos

Diretor de Ensino e Pesquisa do Hospital Geral Roberto Santos

ANEXO 5 - CARTA DE ANUÊNCIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 Faculdade de Medicina da Bahia
DIRETORIA
 Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
 40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.
 Tel.: 55 71 3283.5577 | Fax: 55 71 3283.5567
 www.medicina.ufba.br | medicina@ufba.br



Salvador, 24 de julho de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

A Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia sob o número do CNPJ no: 15180714/0001-04 concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto, as quais serão desenvolvidas no CIUCP (Centro de Integração Universidade-Comunidade do Pelourinho), nesta Faculdade.

Cordialmente,


 Prof. Dr. Luís Fernando Fernandes Adan



Representante Legal da Instituição

Diretor, em exercício, da Faculdade de Medicina da Bahia

Universidade Federal da Bahia

Prof. Luís Fernando Fernandes Adan
 Vice-Diretor
 Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA

ANEXO 6 – CARTA DE ANUÊNCIA DO AMBULATÓRIO DOCENTE-ASSISTENCIAL DE HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA - COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGAR SANTOS

 UFBA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA	Universidade Federal da Bahia Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/, Canela, CEP:40110-060, Salvador-BA. Tel: (71) 3283-8333 E-mail: med09@ufba.br	 Complexo HUPES
---	---	--

Salvador, 25 de julho de 2013.

TERMO DE ANUÊNCIA

Pelo presente informo que o ambulatório docente-assistencial de Hematologia Pediátrica do Centro Pediátrico Professor Hosanah de Oliveira, pertencente ao Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia, CNPJ no: 15180714/0001-04, concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto.

Prof. Hugo Ribeiro Júnior
Diretor Geral do Complexo Hupes

Prof. Dr. Hugo da Costa Ribeiro Júnior
Diretor Geral do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos

1

ANEXO 7- CARTA DA ANUÊNCIA DO HEMOBA



Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia – HEMOBA

Salvador, 01 de Setembro de 2014

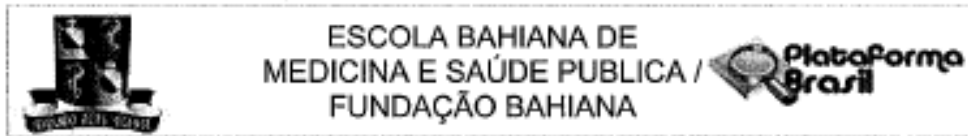
CARTA DE ANUÊNCIA

A Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia, representada pelo Diretor Geral Dr. José Raimundo Mota de Jesus, está ciente dos termos do trabalho e concorda com a realização da pesquisa intitulada: Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia Falciforme desenvolvido por Rozana dos Santos Teixeira e pela professora e orientadora Ana Marice Teixeira Ladeia que faz parte de um projeto mais amplo do Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana Coordenado por Ana Maria Teixeira Ladeia.

José Raimundo Mota de Jesus

Diretor Geral

ANEXO 8 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia Falciforme

Pesquisador: ANA MARICE TEXEIRA LADEIA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 17663913.2.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

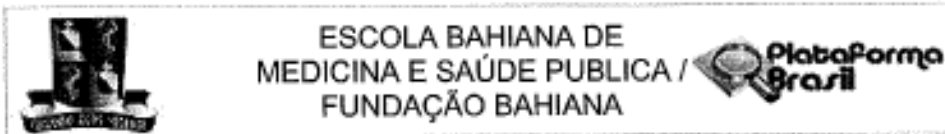
Número do Parecer: 588.913

Data da Relatoria: 19/02/2014

Apresentação do Projeto:

Anemia Falciforme (AF) é uma das doenças hereditárias, monogênicas mais prevalentes em todo o mundo e a mais frequente no Brasil. A Bahia é o estado brasileiro com a maior incidência, com proporção de 1:650 nascidos vivos. É uma doença multisistêmica associada a episódios de adocimento agudo e dano orgânico progressivo. Nas últimas décadas estudos experimentais e clínicos ampliaram a compreensão da fisiopatologia da AF demonstrando que repetidos fenômenos isquêmicos levam a lesão de hipóxia reperfusion, dano ao endotélio vascular e resposta inflamatória. Hoje a AF caracteriza-se por marcada disfunção endotelial, processo inflamatório crônico e hipercoagulabilidade sanguínea. Indivíduos com AF representam um grupo de risco para alterações cardiovasculares em virtude da anemia crônica e de complicações pulmonares.

Endereço: RUA FREI HENRIQUE, Nº 06.
 Bairro: NAZARÉ CEP: 40.050-420
 UF: BA Município: SALVADOR E-mail: osp@bahiana.edu.br
 Telefone: (71)2101-2944



Continuação do Parecer: 566.913

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

1. Demonstrar que crianças e adolescentes com Anemia Falciforme apresentam maior frequência de disfunção endotelial quando comparadas a um grupo controle sem hemoglobinopatia. 2. Demonstrar que os pacientes com Anemia Falciforme apresentam maior frequência de hipertensão pulmonar e dilatação de câmaras cardíacas. 3. Demonstrar que existem além crianças com Anemia Falciforme, quando comparado a crianças sem Anemia Falciforme. 4. Demonstrar que pacientes com AF cursam com alterações respiratórias relacionadas ao sono (hipoxemia, SAOS, dessaturações) quando comparado à crianças sem AF.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar o estado nutricional das crianças e adolescentes com Anemia Falciforme e disfunção endotelial. 2. Correlacionar disfunção endotelial com hemólise e vasoclusão. 3. Correlacionar a avaliação da disfunção endotelial através do método de imagem (vasodilatação da artéria braquial mediada por fluxo) e dosagem de arginase e marcadores inflamatórios e reações espirométricas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa já aprovada por este CEP sendo agora solicitado pela Pesquisadora responsável a inclusão de mais um instrumento de coleta de dados. O referido instrumento irá dar mais especificidade aos objetivos já traçados, sem implicar em novos riscos ou procedimentos aos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

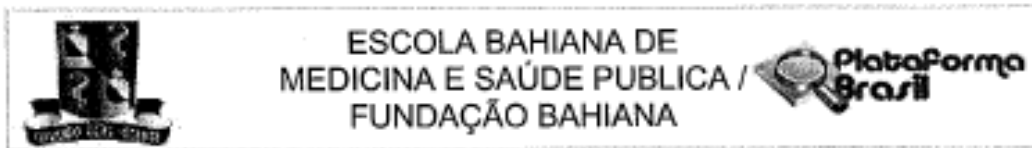
Adequadamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitação de inclusão de questionário aprovada por não implicar em riscos ou alteração do curso da pesquisa.

Endereço: RUA FREI HENRIQUE, Nº 00. CEP: 40.050-420
 Bairro: NAZARÉ
 UF: BA Município: SALVADOR E-mail: cep@bahiana.edu.br
 Telefone: (71)2101-2944



Continuação do Parecer: 555.913

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador. Tendo sido sanadas as pendências anteriormente assinaladas e, estando de acordo com a Res. 466/12 do CNS o projeto encontra-se exequível.

XI 2 DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)

c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

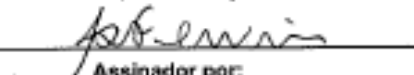
e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;

f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

SALVADOR, 26 de Março de 2014


 Assinador por:
Roseny Ferreira
 (Coordenador)

Endereço: RUA FREI HENRIQUE, Nº 08.
 Bairro: NAZARÉ CEP: 40.050-420
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)2101-2344 E-mail: csp@bahiana.edu.br

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO ESTUDO

ANEXO 9. PARTICIPAÇÃO NO CONGRESSO BAIANO DE CARDIOLOGIA – TEMA LIVRE

40188

Associação entre Disfunção Endotelial e Parâmetros Gravidade de Anemia Falciforme em Crianças e Adolescentes.

ROZANA SANTOS TEIXEIRA, VINCIUS RAMOS MACHADO, MARIANA PEREIRA GARCIA MAIA, MARYA IZADORA DA SILVA PERDIZ, REGINA TERSE TRINDADE RAMOS, ISA LYRA, TATIANE ANUNCIACAO FERREIRA e ANA MARICE TEIXEIRA LADEIA

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, BRASIL - Universidade Federal da Bahia, Salvador- BRASIL.

Alterações hematológicas da anemia falciforme podem agredir as células endoteliais levando à disfunção endotelial precoce. **Objetivo:** Avaliar a associação entre função endotelial e gravidade da Anemia Falciforme (AF) em crianças e adolescentes. **Métodos:** Estudo analítico, transversal com grupo controle, envolvendo 40 crianças e adolescentes estáveis com Hemoglobina SS, das quais, 18 em uso de hidroxiuréia (HDX) e 25 crianças saudáveis, de 6 a 18 anos de idade. A avaliação clínica incluiu questionário-padrão, exame físico e dosagem de hemograma, reticulócitos, bilirrubinas, desidrogenase láctica, perfil lipídico, PCR ultrasensível e mensuração da saturação periférica da oxihemoglobina em repouso. Função endotelial foi avaliada através da vasodilatação mediada por fluxo (VMF) da artéria braquial, utilizando-se método ultrassonográfico com Doppler. Para comparação de médias utilizou-se Teste t; teste de Fischer para variáveis categóricas e o teste de *Spearman* para correlação. **Resultados:** O grupo HbSS e grupo controle apresentaram idade semelhante, $12 \pm 2,9$ anos e $11,2 \pm 3,3$ anos, respectivamente ($p=0,25$). O gênero masculino correspondeu a 66,6% do grupo HbSS enquanto no grupo controle predominou o sexo feminino. A VMF no grupo HbSS foi inferior a do controle, de $10,8 \pm 5,8\%$ e $18,8 \pm 9,4\%$, respectivamente ($p= 0,001$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem HDX ($11,4 \pm 4,7\%$ vs $10,3 \pm 6,8\%$, $p= 0,6$). A VMF apresentou associação negativa com o colesterol total ($r= -0,562$, $p= 0,05$), número de transfusões no último ano ($r= -0,48$ $p=0,03$), total de transfusões até o momento do estudo ($r= -0,7$ $p=0,004$), número de atendimento em emergência no último ano por Crise vasclusiva ($r= -0,5$ $p=0,026$), número de internamentos no último ano por crise vasclusiva ($r= -0,6$ $p= 0,003$). A análise fatorial identificou dois grupos: Um grupo que apresenta mais disfunção endotelial, Doppler de artéria carótida media alterado e maior número de transfusões sanguíneas e outro grupo que apresenta mais crises vasclusivas, hematócrito e hemoglobina mais elevados, TGO mais baixa, Bilirrubina total mais baixa, leucócitos mais elevado e idade acima de 10 anos de idade. **Conclusão.** Crianças e adolescentes clinicamente estáveis com AF, apresentam pior função endotelial que indivíduos saudáveis, O comprometimento da função endotelial se associou com parâmetros de maior gravidade na anemia falciforme.



ANEXO 10. PARTICIPAÇÃO NO 70º CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA- TEMA LIVRE

TLO-121

Associação Da Função Endotelial e Parâmetros de Gravidade da Anemia Falciforme em Crianças e Adolescentes.

ROZANA SANTOS TEIXEIRA, VINCIUS RAMOS MACHADO, MARYA IZADORA DA SILVA PERDIZ, MARIANA PEREIRA GARCIA MAIA, REGINA TERSE TRINDADE RAMOS, TATIANE ANUNCIACAO FERREIRA, ISA LYRA e ANA MARICE TEIXEIRA LADEIA

Escola Bahiana De medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, BRASIL - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, BRASIL.

Alterações hematológicas da anemia falciforme podem agredir as células endoteliais levando à disfunção endotelial precoce. **Objetivo:** Avaliar a associação entre função endotelial e gravidade da Anemia Falciforme (AF) em crianças e adolescentes. **Métodos:** Estudo analítico, transversal com grupo controle, envolvendo 37 crianças e adolescentes estáveis com Hemoglobina SS, das quais, 16 em uso de hidroxiuréia (HDX) e 25 crianças saudáveis, de 6 a 18 anos de idade. A avaliação clínica incluiu questionário-padrão, exame físico e dosagem de hemograma, reticulócitos, bilirrubinas, desidrogenase láctica, perfil lipídico, PCR ultrasensível e mensuração da saturação periférica da oxihemoglobina em repouso. Função endotelial foi avaliada através da vasodilatação mediada por fluxo (VMF) da artéria braquial, utilizando-se método ultrassonográfico com Doppler. Para comparação de médias utilizou-se Teste t; teste de Fischer para variáveis categóricas e o teste de *Spearman* para correlação. **Resultados:** O grupo HbSS e grupo controle apresentaram idade semelhante, 12 ± 3 anos e $11,2 \pm 3$, anos, respectivamente ($p=0,25$). O gênero masculino correspondeu a 62% do grupo HbSS enquanto no grupo controle predominou o sexo feminino. A VMF no grupo HbSS SS foi inferior a do controle, de $11 \pm 5,5$ % e $18,6 \pm 9$ %%, respectivamente ($p= 0,001$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem HDX ($10,4 \pm 6,5$ % vs $11,6 \pm 4,4$ %, $p= 0,6$). Crianças e adolescentes portadores de HBSS, com FMD abaixo de 10% apresentam correlação negativa com número de crises síndrome torácica aguda/ ano ($r = -0,73$, $p= 0,049$), e com colesterol total ($r = -0,6$ $p= 0,049$). Há tendência para associação negativa da VMF com bilirrubina total ($r = -0,5$ $p=0,08$) e com LDL-C ($r = -0,5$ $p=0,08$) e com número de transfusões sanguíneas ($r = -0,6$, $p 0,09$). **Conclusão.** Crianças e adolescentes clinicamente estáveis com AF, apresentam pior função endotelial que indivíduos saudáveis, bem com associação entre marcadores de gravidade de anemia falciforme e agressão endotelial.



Organização



Apoio

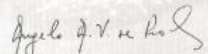



CERTIFICADO

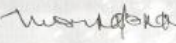
TLO 121 - Associação Da Função Endotelial e Parâmetros de Gravidade da Anemia Falciforme Em Crianças E Adolescentes

autoria: Rozana Santos Teixeira, Víncius Ramos Machado, Marya Izadora Da Silva Perdiz, Mariana Pereira Garcia Maia, Regina Terse Trindade Ramos, Tatiane Anunciacao Ferreira, Isa Lyra, Ana Marice Teixeira Ladeia

Foi apresentado no **70º Congresso Brasileiro de Cardiologia**, realizado de **18 a 21 de setembro de 2015**, na cidade de Curitiba - PR, na qualidade tema livre ORAL, na sessão: Aterosclerose, Epidemiologia e Prevenção.


Angelo Amato Vincenzo de Paola
Presidente


Maria da Consolação Vieira Moreira
Diretora Científica


José Carlos Moura Jorge
Presidente do 70º Congresso

**ANEXO 11. PARTICIPAÇÃO NO 37º CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA -
TEMA LIVRE E PREMIAÇÃO COMO SEGUNDO MELHOR TRABALHO CIENTÍFICO DO
CONGRESSO**

**Disfunção Endotelial e sua relação com uso de Hidroxiuréia em crianças e
adolescentes com Anemia Falciforme**

ROZANA TEIXEIRA; REGINA TERSE RAMOS; MARYA ISADORA DA SILVA
PERDIZ; MARIANA PEREIRA GARCIA MAIA; VINÍCIUS RAMOS MACHADO; ISA
LYRA; NEY BOASORTE; TATIANE ANUNCIAÇÃO FERREIRA; ANA MARICE
LADEIA

Objetivos: Avaliar a presença de disfunção endotelial em crianças e adolescentes com AF; comparar disfunção endotelial entre falcêmicos em uso e não uso de hidroxiuréia (HDX). **Material e Métodos:** Estudo seccional, analítico com grupo de comparação, envolvendo 40 crianças e adolescentes estáveis com Hemoglobinopatia SS (HbSS), das quais 18 em uso de hidroxiuréia (HDX), e 25 crianças saudáveis, de 6 a 18 anos de idade. Foi aplicado questionário estruturado, realizado dosagem de reticulócitos, bilirrubinas, desidrogenase láctica, transaminases, perfil lipídico, glicemia, hemograma. Função endotelial foi avaliada através da vasodilatação mediada por fluxo (VMF) da artéria braquial, utilizando-se método ultrassonográfico com Doppler. Para comparar médias utilizou-se Teste t; para comparar proporções teste de Fischer. Os dados foram processados no programa SPSS versão 20. **Resultados:** O grupo HbSS e o grupo de comparação apresentaram idade semelhante, $12,3 \pm 3$ anos vs $11,4 \pm 3$ anos ($p=0,24$). O gênero masculino correspondeu a 60% do grupo HbSS, diferentemente do grupo comparativo (22,7%; $p=0,012$). A média \pm DP da VMF nos pacientes com AF foi inferior a do grupo comparação sendo, respectivamente, $10,5 \pm 5,2\%$ vs $18,5 \pm 8,9\%$ ($p < 0,001$). Entre os pacientes saudáveis, o percentil 10 da VMF foi de 8,4%, sendo que 4% do grupo saudável e 37% no grupo HbSS apresentaram valores de VMF abaixo deste patamar. Entre as crianças SS, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que usavam ou não HDX ($10,8 \pm 4\%$ vs $9,9 \pm 6\%$ $p=0,56$). **Conclusões:** Disfunção endotelial na AF foi precoce; Pacientes em uso de HDX podem ter função endotelial melhorada após introdução da droga. VMF abaixo de 8,4% pode ser considerado indicador de lesão endotelial.



CERTIFICADO

Certificamos que

ROZANA TEIXEIRA; REGINA TERSE RAMOS; MARYA ISADORA DA SILVA PERDIZ; MARIANA PEREIRA GARCIA MAIA; VINÍCIUS RAMOS MACHADO; ISA LYRA; NEY BOA SORTE; TATIANE ANUNCIÇÃO FERREIRA; ANA MARICE LADEIA

Protocolo CNA
nº 112739
Complemento: 112742



Participaram do 37º CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA, realizado no período de 13 a 16 de outubro de 2015 no Rio de Janeiro - RJ.

na qualidade de autores do Tema Livre: *DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E SUA RELAÇÃO COM USO DE HIDROXIURÉIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME*, classificado em 2º lugar na categoria *Melhor Trabalho*

Promoção:




Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2015

Realização:




Eduardo da Silva Vas
Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria


Edson Ferreira Liberal
Presidente do 37º Congresso