



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

**CARLA VERÔNICA PAIXÃO MARQUES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DOR EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME: ALTERAÇÕES  
MORFOFUNCIONAIS CEREBRAIS E EFICÁCIA ANALGÉSICA DE UM  
PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM ACUPUNTURA A LASER**

**Salvador - Bahia**

**2022**

**CARLA VERÔNICA PAIXÃO MARQUES**

**DOR EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME: ALTERAÇÕES  
MORFOFUNCIONAIS CEREBRAIS E EFICÁCIA ANALGÉSICA DE UM  
PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM ACUPUNTURA A LASER**

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

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Fontes Baptista

**Salvador - Bahia**

**2022**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar tantas oportunidades e me fazer sentir cercada de anjos na caminhada da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Abrahão por ser um exemplo de ser humano e profissional e vir me orientando não só agora no mestrado mas desde o início da minha vida acadêmica a achar e cumprir com veemência a minha missão nesse mundo. Estendo esse carinho a Prof Dra Katia , responsável por esse encontro e não menos importante no meu caminho profissional.

Ao meu pai , Carlos Augusto , que me pediu para que não desistisse ...

Mãe , sempre dediquei todas as vitórias , alegrias e conquistas de minha vida a Senhora e meu pai . Em todas as minhas derrotas tive o seu apoio. Seguirei na mesma tocada , pois muitos sonhos tenho a realizar e te dedicar .

Aos meus irmãos Julio , Alexandre e Viviane pelo companheirismo e amor . Aos meus sobrinhos Victor , Clara Luz, Corinna , Andreas , Teresa e Mel. Nós somos o que eles sonharam.

Agradeço a todo o grupo de pesquisa do NESF pela parceria e questionamentos para que esse trabalho saísse o mais impecável possível. Um agradecimento mais do que especial para Tiago , Giovana , Jamile e Alai . Vocês foram os meus braços e pernas nos dias de dificuldade . Gratidão a vocês por toda a vida.

Aos meus amigos da vida que me enchem de amor e de vontade de continuar...

## **INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

EBMSP - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos-  
Complexo HUPES

Ambulatório Especializado em Doença Falciforme do Multicentro de Saúde Carlos Gomes

ABADFAL - Associação Baiana dos Portadores de Doença Falciforme

UFSCAR- Universidade Federal de São Carlos

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AINES- antiinflamatório não esteróides

AL- acupuntura a LASER

BOLD- blood oxygenation level dependent

CCA- córtex cingulado anterior

CCP- córtex cingulado posterior

CPFm- córtex pré frontal medial

DF- doença falciforme

DMN- default mode networkpadrão

DP- desvio

EEG - eletroencefalografia

EEGq- eletroencefalografia quantitativa

fMRI- ressonância magnética funcional

Hb- hemoglobina

Lilacs - Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da saúde

MTC- medicina tradicional chinesa

OMS- Organização Mundial de Saúde

RM- ressonância magnética estrutural

ROI- regiões de interesse

RsFC - estado de repouso

SatO2-Saturação de oxigênio

SciELO-Scientific Electronic Library Online

SLN- Rede Saliência

SM- Rede Sensório Motora

SNC- Sistema Nervoso Central

TCD - Ecografia com Doppler Transcraniano

**LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS**

FLUXOGRAMA - pág 24

TABELA 1 - Perfil clínico demográfico dos estudos incluídos- pág 26

TABELA 2 - Resultado da avaliação de qualidade dos estudos e riscos de viés utilizando a Newcastle Ottawa - pág 27

TABELA 3 - Regiões do cérebro com alteração da conectividade em crianças , adolescentes e adultos jovens com DF - pág 29

QUADRO 1 - pág 28

## SUMÁRIO

DOR EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CEREBRAIS E EFICÁCIA ANALGÉSICA DE UM PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM ACUPUNTURA A LASER	
1.Introdução	pág 11
2.Racional Teórico	pág 12
2.1.Doença Falciforme, dor e conectividade cerebral	pág 12
2.2.Abordagens terapêuticas para a dor	pág 13
2.3.Acupuntura	pág 14
2.4.LASER	pág 14
2.5.Acupuntura usando LASER	pág 15
3. Objetivos	pág 15
3.1. Objetivo Geral	pág 15
3.1.1. Estudo 1	pág 15
3.1.2. Estudo 2	pág 15
3.2 Objetivo Secundário	pág 15
3.2.1.Estudo 1	pág 15
4.Hipóteses	pág 16
5.Casuística , Material e Método	pág 16
5.1. Desenho do estudo	pág 16
5.1.1. Estudo 1	pág 16
5.1.2.Estudo 2	pág 16

5.2.População de Referência	pág 16
5.2.1.Estudo 1	pág 16
5.2.2.Estudo 2	pág 16
5.3.Características da população do estudo	pág 17
5.3.1.Estudo 1	pág 17
5.3.2.Estudo 2	pág 17
5.4.Critérios de inclusão e exclusão	pág 17
5.4.1.Estudo 1	pág 17
5.4.2.Estudo 2	pág 17
5.5.Grupos estudados	pág 17
5.5.1. Estudo 1	pág 17
5.5.2.Estudo 2	pág 18
5.6.Variáveis	pág 18
5.6.1. Estudo 1	pág 18
5.6.2.Estudo 2	pág 18
5.7. Controle de variáveis de confusão para controle do viés de perda	pág 18
5.7.1.Estudo 1	pág 18
5.7.2.Estudo 2	pág 18
5.8. Etapas do estudo	pág 19
5.8.1.Estudo 1	pág 19
5.8.1.1 Captação da amostra nas instituições referenciadas	pág 19



5.8.1.2. Preenchimento da escala Wong Baker	pág 19
5.8.1.3. Randomização do estudo	pág 19
5.8.1.4. Realização da acupuntura a LASER	pág 19
5.8.1.5. Avaliação Eletroencefalográfica	pág 20
5.8.2. Estudo 2	pág 21
6.Técnica e Equipamentos	pág 21
6.1. Estudo 1	pág 21
6.2.Estudo 2	pág 21
7. Descontinuidade do estudo	pág 21
7.1.Estudo 1	pág 21
7.2. Estudo 2	pág 21
8.Planejamento Estatístico	pág 22
8.1.Estudo 1	pág 22
8.1.1. Estatística Descritiva	pág 22
8.1.2.Estatística Inferencial	pág 22
8.1.3.Cálculo amostral	pág 22
8.2.Estudo 2	pág 22
9.Potenciais dificuldades durante a coleta	pág 23
9.1.Estudo 1	pág 23
9.2.Estudo 2	pág 23
10. Resultados	pág 23

10.1.Estudo 1	pág 23
10.2.Estudo 2	pág 23
11. Aspectos Éticos	pág 31
11.1.Estudo 1	pág 31
11.2.Estudo 2	pág 31
12.Referências	pág 31
ANEXOS	
I. Estudo 1	pág
II. Estudo 2	pág

**DOR EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME: ALTERAÇÕES  
MORFOFUNCIONAIS CEREBRAIS E EFICÁCIA ANALGÉSICA DE UM  
PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM ACUPUNTURA A LASER**

RESUMO

A doença falciforme (DF) é uma patologia de alta prevalência no Brasil. Suas complicações clínicas estão principalmente relacionadas a oclusões vasculares, provocando exposição repetitiva à dor desde o primeiro ano de vida, que a longo prazo pode levar a alterações plásticas na atividade cerebral. O tratamento convencional da dor crônica associada à DF é essencialmente farmacológico e não raro está acompanhado de efeitos adversos. O uso de métodos não invasivos como a acupuntura LASER pode ser eficaz contribuindo para reduzir a ingestão de fármacos e seus efeitos colaterais. Este trabalho é constituído por dois estudos: o primeiro busca analisar a eficácia da aplicação da acupuntura a LASER no tratamento da dor, objetivando secundariamente compreender se parâmetros eletrofisiológicos cerebrais podem identificar os participantes com DF e dor e se estes mesmo parâmetros podem identificar respondedores ao tratamento. O segundo estudo busca compreender as alterações morfofuncionais cerebrais em crianças, adolescentes e adultos jovens com DF e dor através de uma revisão sistemática da literatura.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a highly prevalent pathology in Brazil. Its clinical complications are mainly related to vascular exclusions that cause repetitive repetitions of pain from the first year of life, which a long term can lead to a plastic change in brain activity. The treatment of chronic disease associated with SCD is essentially pharmacological and is often accompanied by conventional adverse effects. The use of non-effective methods for LASER can be effective in reducing medication intake and its side effects. This first one is chosen because it identifies a research and two studies of acupuncture treatment, aiming secondarily to understand if the participants to FD and can pain respond if these same parameters can respond to the same parameters of the application. . The second study comprises a morphofunctional review in children, adolescents and young adults with SCD and pain through a systematic review of the literature.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é a entidade hereditária mais frequente no Brasil, estando frequentemente associada à presença de dor aguda e crônica. Dados do Ministério da Saúde apontam que 3.500 crianças nascem com DF por ano no Brasil e cerca de 200.000 apresentam traço falcêmico. A distribuição do gene S no Brasil é bastante heterogênea, dependendo da composição negróide ou caucasóide da população. Assim, a prevalência de heterozigotos para a Hb S é maior nas regiões Norte e Nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%).<sup>2</sup> Estima-se o nascimento de 700 a 1.000 novos casos anuais de portadores de DF no país. Além da África e Américas, é hoje encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia.<sup>24</sup>

A dor aguda na DF é decorrente da interação de uma série de fatores neuroimunes e neurovasculares consequentes às complicações da forma afoiçada das hemácias que terminam por aderir à parede do vaso sanguíneo<sup>1</sup>. As consequências da aderência são a oclusão vascular, com redução do fluxo do sangue nos capilares, estase venosa e hipóxia, que levam a crises dolorosas agudas e à lesão tecidual orgânica crônica e progressiva.<sup>30</sup> Evitar a vasocclusão com consequente redução do fluxo sanguíneo tem sido apontada como estratégia interessante para a prevenção das crises algicas. O Manual de Condutas Básicas na AF formulado pelo Ministério da Saúde instrui ainda o aumento da ingestão hídrica e o uso de analgésicos no caso de dor leve.<sup>6</sup> As crises de dor aguda em pacientes com DF frequentemente evoluem para quadros de dor crônica, que normalmente estão associadas a doenças secundárias como necrose avascular de articulações<sup>2</sup>, úlceras cutâneas<sup>3</sup> e dor neuropática.<sup>11</sup>

Em relação às estratégias analgésicas preconizadas para pacientes com DF, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere a associação de fármacos quando o efeito analgésico não for satisfatório. Sempre que não obter analgesia adequada, é necessário passar ao degrau seguinte da escada analgésica.<sup>30</sup> Outras formas de terapia podem ser utilizadas alternativamente ou em associação como esquemas de transfusão repetitiva, o transplante de medula óssea e a administração oral de hidroxiuréia, um agente indutor da síntese de hemoglobina fetal.<sup>5</sup> Esses tratamentos de segunda linha têm efeito secundário para o controle da dor além dos riscos iatrogênicos e custos mais elevados. Estratégias não farmacológicas têm sido objeto de investigação para o controle da dor em pacientes com DF<sup>12</sup>, incluindo psicoterapia<sup>13,14</sup> e acupuntura<sup>15,16</sup>. Apesar desta última terapia se mostrar útil para o controle da dor associada à DF, ela normalmente é pouco tolerada em crianças. Nesse contexto, a acupuntura a LASER<sup>17</sup> pode ser uma terapia complementar útil no tratamento da dor desses

indivíduos contribuindo para reduzir a ingestão farmacológica pelos portadores de DF. Apesar desta vantagem sobre a acupuntura com agulhas, não se conhece a eficácia desta intervenção para o controle da dor em crianças com DF, assim como tampouco seu potencial em reverter alterações mal adaptativas associadas à dor no cérebro desses pacientes.

## 2. RACIONAL TEÓRICO

### 2.1. Doença falciforme, dor e conectividade cerebral

A doença falciforme (DF) é multissistêmica e debilitante. Nela o gene da hemoglobina apresenta uma mutação que causa uma polimerização anormal da hemácia fazendo com que estas tenham a forma de foice. Esta característica estrutural facilita a obstrução dos vasos sanguíneos, causando crises vaso-oclusivas que prejudicam o suprimento de oxigênio aos órgãos e vísceras, resultando em distúrbios neuroimunes e neurovasculares associados a lesão de órgãos-alvo e dor aguda recorrente e dor crônica<sup>31</sup>.

A Sociedade Internacional para Estudos da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) define dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável e descrita em termos de lesões teciduais reais ou potenciais<sup>36</sup>. A maioria das crianças com DF experimenta pelo menos uma crise de dor/ano e essas crises têm impactos negativos significativos<sup>33</sup>. A presença de dor a longo prazo pode afetar a atividade cerebral global<sup>8</sup>. A falta de controle inibitório no corno dorsal da medula espinal tanto por disfunção local, quanto supraespinal causa alteração fenotípica de fibras A $\beta$  especializadas na condução de estímulos não dolorosos, favorecendo a sensibilização central<sup>23</sup>.

A literatura hoje existente apoia um modelo em que a maturação do cérebro ocorre ao longo de um eixo organizacional hierárquico. Este processo evolutivo é acompanhada por padrões de expansão cortical com regiões do cérebro apresentando ganhos funcionais adicionais acompanhado de aumento na espessura do córtex, tendo o seu pico entre 9 a 12 anos de idade e, posteriormente, estabilizando ou apresentando um declínio<sup>39</sup>. A presença de um quadro doloroso desde a infância, como é característico na DF, provavelmente gera efeitos a longo prazo que podem afetar a atividade cerebral como um todo, incluindo as redes cerebrais que são necessárias ao desempenho de todo o conjunto de funções possíveis a um ser humano<sup>31</sup>. A sensibilização central de múltiplas estruturas provocadas por episódios de dor pode levar a uma mudança mal-adaptativa de importantes redes anatômicas/funcionais

que processam informações em todas as dimensões da dor, ou seja, sensorial, emocional e cognitiva,<sup>23</sup> levando a um aumento da vulnerabilidade a lesões.<sup>13</sup>

Os exames de imagem em pediatria podem identificar pacientes de alto risco para progressão da doença no SNC na idade adulto jovem<sup>4</sup>. O uso do EEG para avaliar anormalidades da função cerebral e estabelecer um marcador cerebral de dor é atraente pois é seguro, não invasivo, amplamente disponível e potencialmente móvel<sup>16</sup> tendo como fraqueza a baixa resolução espacial, resultando em um baixo sinal de estruturas cerebrais mais profundas<sup>13</sup>. A ressonância magnética em vivo permite a quantificação das propriedades macroscópicas das estruturas corticais tendo como especificidade a ressonância magnética funcional que tem a capacidade de detectar variações no fluxo sanguíneo em resposta a atividade neuronal através do efeito BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*). Em estado de repouso pode-se avaliar a capacidade espaço - temporal e identificar estruturas e redes cerebrais mais profundas com alta resolução espacial.<sup>25</sup>

Estudos de conectividade funcional em estado de repouso (RFC) da atividade cerebral estão sendo cada vez mais utilizados para estudar condições de dor crônica. A RFC envolve correlacionar o curso de tempo de mudanças de sinal BOLD de ressonância magnética entre várias regiões do cérebro. Na ausência de estímulos externos, essa atividade do estado de repouso fornece uma visão de redes cerebrais funcionalmente interconectadas enquanto os pacientes estão em repouso, o que é ideal para o avaliação da dor clínica espontânea em curso<sup>12</sup>, identificando pacientes com alto risco para progressão da DF no SNC na idade adulto jovem e estimulando terapias complementares e ou tratamentos mais agressivos.<sup>4</sup>

## 2.2. Abordagens terapêuticas para a dor na DF

Apesar da compreensão aprofundada da dor aguda do DF, aliviá-la continua sendo um grande desafio em crianças. A maioria dos episódios de dor na DF são controlados em casa seguindo o plano de ação da escada analgésica da Organização Mundial da Saúde (OMS) para controle da dor<sup>31</sup>. Esta escada inclui o uso de antiinflamatórios não esteróides (AINEs), opióides, hidratação, analgésicos comuns, medicamentos adjuvantes e com tendência recente aos anestésicos dissociativos.<sup>34</sup> Entretanto, apesar deste modelo de analgesia ser amplamente preconizado, na prática os opióides atualmente são a base do tratamento de crises álgicas em crianças falcêmicas<sup>3</sup>. No entanto, o uso de opióides de forma crônica na DF pode afetar negativamente os sistemas orgânicos e gerar desenvolvimento da tolerância opióide ou

hiperalgesia induzida por opióide, podendo levar a longo prazo a efeitos adversos graves e diminuição do controle satisfatória da dor<sup>34</sup>

Outra alternativa frequente para o tratamento da dor na DF é o uso de hidroxiureia, um medicamento que aumenta a quantidade de hemoglobina fetal no sangue<sup>32</sup>. Segundo os dados apresentados por Bandeira et al,<sup>1</sup> pacientes entre sete e 17 anos de idade apresentaram boa resposta clínica com o tratamento com hidroxiureia, incluindo redução do número de internações por episódios dolorosos e a necessidade transfusional. Apesar de eficaz, esta abordagem também tem desvantagens. As reações adversas incluem mielossupressão, perturbação gastrointestinal, erupção cutânea, enxaqueca, potencial teratogênico e possível carcinogênese. Há relatos de surgimento de mielotoxicidade, principalmente plaquetopenia e neutropenia, durante o uso da medicação, porém na sua maioria reversíveis após suspensão da droga<sup>36</sup>.

Sendo assim, apesar de ser útil, a eficácia da analgesia farmacológica é variável para o controle da dor.<sup>35</sup> Uma abordagem reabilitadora interdisciplinar incluindo fisioterapia, tratamento psicológico e técnicas integrativas tem-se mostrado eficaz em aprimorar o controle da dor na DF.<sup>15</sup>

### 2.3.Acupuntura

A acupuntura foi considerada útil e pode ser de valor clínico em um programa de tratamento multidisciplinar.<sup>16</sup> Ela envolve a estimulação de pontos específicos localizados ao longo das linhas dos meridianos correspondentes ao fluxo de energia através do corpo, que podem ser estimulados tradicionalmente através de agulhas finas, evoluindo para aplicação de pressão, uso de corrente elétrica ou de LASER de baixa intensidade para estimular esses pontos - acupuntura LASER (AL)<sup>29</sup>.

### 2.4.LASER

O LASER, acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” foi teorizado por Einstein em 1917 e materializado por Maiman.<sup>37</sup> Quando aplicado em baixa potência oferta energia luminosa que possui efeitos terapêuticos.<sup>21</sup> Aplicado sobre os acupontos (pontos de acupuntura) adequados, o LASER de baixa potência se torna uma terapia anti-inflamatória, analgésica e regeneradora celular<sup>18</sup> que pode ser útil no controle da dor em crianças com anemia falciforme.

## 2.5. Acupuntura usando LASER

O ponto de acupuntura irradiado pelo LASER precisa receber energia suficiente para provocar o efeito fisiológico a nível celular, com base no princípio mais amplo da fotobiomodulação,<sup>19</sup> que utiliza fótons para estimular a formação biológica corporal.<sup>14</sup> A energia química dentro da célula pode ser então convertida na forma de trifosfato de adenosina, que leva ao alívio da dor e proliferação celular após a absorção de energia fotônica.<sup>12</sup> A Associação Mundial de Terapia a LASER recomenda uma saída de potência radiante de 5-500 mW, com uma janela clínica apropriada usando 780-860 nm.<sup>25</sup> Muitos estudos relatam resultados positivos usando a dosagem clínica apropriada sugerida por Baxter et al em sua revisão sistemática de uma potência mínima de 10 mW e uma dose de energia de pelo menos 0,5 J por ponto.<sup>11</sup> Os efeitos do LASER sobre parâmetros neurovegetativos em ratos aconteceram com 20 minutos de estimulação, mas não 10 e 30 minutos<sup>9</sup>.

A AL já se mostrou eficaz no tratamento de crianças reduzindo a intensidade e o número de dores de cabeça, diminuindo as crises de vômito no pós operatório, reduzindo a duração da terapia com morfina e a permanência hospitalar em lactentes com síndrome de abstinência neonatal.<sup>11</sup> A AL poderia ser uma opção no controle da dor na DF, pois não exige o uso/inserção de agulhas (bastante útil no tratamento de crianças), porém pouco se sabe sobre a sua eficácia nesta condição. Até onde sabemos, houve apenas um estudo avaliando o uso da acupuntura tradicional na população de células falciformes onde os autores concluíram que houve uma redução média da dor de 2,1 pontos imediatamente após a acupuntura.<sup>19</sup>

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. GERAIS:

3.1.1. Estudo 1. Estabelecer a eficácia da AL no tratamento da dor em crianças com DF;

3.1.2. Estudo 2. Determinar as redes cerebrais envolvidas com o processamento da dor em crianças, adolescentes e adultos jovens com DF

### 3.2. OBJETIVO SECUNDÁRIO:

3.2.1. Estudo 1. Verificar se a AL deflagra modificações detectadas em eletroencefalografia quantitativa que possam estar relacionadas com a mudança na intensidade da dor;



#### 4. HIPÓTESES:

Estudo 1.

4.1 A AL é eficaz no controle da dor de crianças com DF;

4.2. A eficácia da AL no controle da dor está relacionada à mudanças na atividade eletroencefalográfica.

Estudo 2. Existem alterações cerebrais características em crianças, adolescentes e adultos jovens com DF.

#### 5. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

5.1.1 Estudo 1

Trata-se de um ensaio clínico paralelo cego e randomizado. A randomização se dará através do uso de um software próprio (randomization.com) e somente o pesquisador assistente teve acesso a esta informação;

5.1.2. Estudo 2

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura nas bases de dados PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Scientific Electronic Library Online (SciELO) de março de 2019 a dezembro de 2021 utilizando os seguintes descritores: **doença falciforme, criança, conectividade cerebral, conectividade funcional, dor.**

5.2. População de referência

5.2.1. Estudo 1: Crianças oriundas do Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e do Ambulatório Especializado em Doença Falciforme do Multicentro de Saúde Carlos Gomes, Bahia, Brasil.

5.2.2. Estudo 2: Estudos que tivessem incluído crianças ( 0 -9 anos ) , adolescentes ( 10-19 anos ) , adultos jovens (20-24 anos) e jovens adultos ( 25-29 anos) com DF seguindo os critérios de classificação da OMS.

### 5.3. Características da população de estudo

5.3.1. Estudo 1: Crianças com diagnóstico de DF e com dor na última consulta hematológica.

5.3.2. Estudo 2: Crianças , adolescentes , adultos jovens e jovens adultos com DF com história de dor

### 5.4. Critérios de inclusão e exclusão

5.4.1. Estudo 1: Serão incluídas no estudo crianças de seis a 12 anos, de qualquer gênero, portadoras de DF confirmada por exame laboratorial (teste de falcização ou eletroforese de hemoglobina), relato de queixa de dor em consulta(s) hematológica(s) e prova escrita da autorização de seu responsável para inclusão no estudo através da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

Serão estabelecidos como critérios de não-inclusão a presença de história prévia de fratura há um ano ou menos, história prévia de osteomielite, febre reumática, artrite reumatóide, leucemia, neoplasia maligna, portadores de paralisia cerebral ou uso regular de opióides.

5.4.2. Estudo 2: Foram inclusos na revisão sistemática os estudos que atendessem a cada um dos seguintes critérios de elegibilidade: a) tivessem incluído crianças ( 0 -9 anos) , adolescentes ( 10-19 anos ) , adultos jovens (20-24 anos) e jovens adultos ( 25-29 anos) com DF seguindo os critérios de classificação da OMS; b) examinou intensidade/frequência/duração da dor e/ou comprometimento funcional da dor; c) examinou a conectividade cerebral; d) examinou a espessura cerebral e) eram estudos quantitativos; f) utilizar como medidas de avaliação a ressonância magnética , a ressonância magnética funcional , a eletroencefalografia , a ecografia com doppler transcraniano e a angiografia por ressonância magnética. Artigos não empíricos (por exemplo, artigos de revisão, comentários, diretrizes práticas, capítulos de livros, relatos de caso, dissertações, resumos de conferências) foram excluídos do estudo , assim como indivíduos com faixa etária acima da proposta pelo estudo , e estudos sem comparação entre a intensidade da dor entre os grupos ),

### 5.5. Grupos estudados

5.5.1. Estudo 1: A população será dividida em três grupos, sendo o primeiro o grupo controle com crianças saudáveis, o segundo o grupo com crianças com DF submetidas a AL e o terceiro o grupo de crianças com DF que receberão a AL simulada (SHAM).

5.5.2. Estudo 2: A população do estudo será delimitada em crianças ( 0 -9 anos ) , adolescentes ( 10-19 anos ) , adultos jovens (20-24 anos) e jovens adultos ( 25-29 anos) .

## 5.6. Variáveis

5.6.1- Estudo 1: O estudo terá como variáveis: a) Dados sociodemográficos: idade, sexo, idade de diagnóstico; b) Clínicas: Estimativas do grau de dor pela escala de Wong Baker nos diferentes momentos do estudo, bem como as doses, substâncias ativas e frequências dos medicamentos utilizados, resultados de exames prévios de eletroforese de Hb, comorbidades conhecidas, história de internações, uso da hidroxiureia e história de transfusão sanguínea

5.6.2. Estudo 2: O estudo terá como variáveis a idade , o gênero, exames laboratoriais, o uso da hidroxiureia, o número de internações nos últimos 12 meses, a SatO<sub>2</sub> , transfusões sanguíneas , a concentração de Hb , a correlação com a Hb fetal, história de AVC , avaliação cognitiva, classe social.

## 5.7. Controle de variáveis de confusão para controle do viés de perda

5.7.1. Estudo 1: Para controle do viés de perda serão inseridos no estudo três sujeitos a mais em cada grupo, prevendo desistências. Para prevenir o viés de adesão, foi planejado o cegamento dos sujeitos ao grupo de intervenção. O sigilo de alocação será garantido através do uso envelopes lacrados contendo o grupo ao qual cada criança será alocada. Para controle do viés de aferição, especificamente o viés de observação, os sujeitos serão entrevistados por dois pesquisadores somente, que passarão por um treinamento de padronização da avaliação clínica, utilizando perguntas previamente estruturadas. O viés de diagnóstico será evitado pelo uso do instrumento de avaliação da dor validado e com bons níveis de confiabilidade. Para minimizar o viés de detecção, os padrões diagnósticos para seleção de pacientes serão uniformizados através de uma entrevista durante a consulta hematológica onde a criança deve estar relatando dor. As variáveis colhidas são de alta validade lógica, no entanto algumas estão sob influência de falsa afirmação. Possíveis variáveis confundidoras serão excluídas pelos critérios de exclusão.

5.7.2. Estudo 2: Para a avaliação do risco de viés, os artigos selecionados foram analisados seguindo a Newcastle-Ottawa Scale com avaliação de oito itens, categorizados em três grupos: 1) seleção dos grupos de estudo; 2) comparabilidade dos grupos e; 3) verificação do desfecho de interesse. A pontuação da escala varia entre quatro (mínima) e nove (máxima).

## 5.8. Etapas do estudo

### 5.8.1 . Estudo 1

#### 5.8.1.1.Captação da amostra nas instituições referenciadas

As crianças serão recrutadas após anuência no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Ambulatório Magalhães Neto- HUPES e no Ambulatório Especializado em Doença Falciforme do Multicentro de Saúde Carlos Gomes, Bahia, Brasil.

#### 5.8.1.2. Preenchimento da Escala Wong Baker

O preenchimento da escala antes e depois da aplicação da AL será realizada levando em consideração a opinião dos entrevistados frente ao desconforto sentido. As crianças deverão se identificar com uma das imagens dos seis cartões apresentados que variam de um sorriso a expressões faciais de tristeza e choro, representando a classificação do comportamento da dor.

#### 5.8.1.3.Randomização do Estudo e alocação dos participantes

A randomização das crianças do estudo será realizada previamente através do software randomization.com. Os participantes serão alocados por um pesquisador que não fará parte de nenhuma outra etapa do estudo. Ele sorteará a alocação através de envelopes opacos contendo o grupo para o qual o participante será alocado e informará ao pesquisador que irá fazer a intervenção.

#### 5.8.1.4.Realização da Acupuntura a LASER

As sessões de acupuntura foram realizadas com o paciente sentado, utilizando-se roupas leves e óculos de proteção. Durante a sessão será solicitado às crianças manterem-se o mais quietas e relaxadas possível. A técnica será realizada por uma acupunturista experiente com 10 anos de experiência na Medicina Tradicional Chinesa. A escolha dos acupontos que conduzirão o chamado tratamento energético de acordo com a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) será realizado observando-se parâmetros habituais como o pulso, aspecto da língua, informações psicológicas e fisiológicas. A escolha dos pontos de acupuntura foi dada seguindo o Consort de Acupuntura (MacPherson et al 2010), identificando cada indivíduo como único. Os pontos nesta prática devem ser prescritos de acordo com o estado do paciente em um determinado momento mas seguindo a escolha do meridiano dos pontos de acordo

com o local da dor através dos seus pontos Luo, pontos ashis e através da fisiologia energética da patologia que no caso da doença falciforme é identificada como Deficiência de Xue e Livre Fluxo interrompido como sugerido por Baeumler. As crianças participantes com diagnóstico de DF serão submetidos a uma sessão de acupuntura de 20 minutos de duração, com 6J de potência em cada acuponto planejada de acordo com o grupo no qual forem incluídos: grupo AL (acupuntura a LASER ativa); grupo SHAM (acupuntura com aparelho desligado). O aparelho que será utilizado é o Therapy XT/DMC Equipamentos (Campinas, Brasil).

#### 5.8.1.5. Avaliação eletroencefalográfica

A densidade de potência relativa obtida pelo eletroencefalograma será medida antes e depois da intervenção. Um eletroencefalógrafo (EEG Brainet 36, EMSA, Brasil) com 30 eletrodos dispostos de acordo com a sistema de eletroencefalografia 10/20 será utilizado nas seguintes localizações dos eletrodos: F7 T3 T5 Fp1 F3 C3 P3 O1 F8 T4 T6 Fp2 F4 C4 P4 O2 Fz Cz Pz Oz FT7 FT8 TP7 CP3 FC3 CPz FCz CP4 FC4 TP8. Os dados de EEG serão coletados a uma taxa de amostragem de 600 Hz e referenciados ao canal Cz. A impedância será mantida abaixo de 5 KOhm para todos os eletrodos e o ambiente de gravação será mantido em luz suave e protegido por uma gaiola de Faraday. Os participantes serão instruídos a sentar-se confortavelmente em uma cadeira, mantendo os olhos abertos durante a gravação do EEG, durante cinco minutos.

O pré-processamento dos dados EEG será feito usando o MATLAB versão 2015 e a caixa de ferramentas EEGlab versão 14. Os sinais serão filtrados offline com uma passagem de banda entre 0,5 e 45 Hz. Os dados de EEG serão segmentados em épocas de 1,71 s para permitir uma análise de densidades de potência em frequências que variam de 1,2 a 30 Hz. Artefatos de EEG com amplitude mínima abaixo de -750 ou amplitude máxima acima de 750  $\mu$ V serão rejeitados usando um protocolo semiautomático. Dados de EEG com mais de 50% de épocas rejeitadas serão excluídos de análises posteriores. Depois do protocolo de rejeição de artefato, todos os dados EEG serão ajustados para ter o mesmo número de épocas.

A densidade de potência será calculada pela transformada rápida de Fourier em cada época e eletrodos, separadamente para cada participante. As densidades de potência médias serão agrupadas em bandas delta (1,2-3,5 Hz), frequência teta (4-7 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (13-30 Hz). As regiões de interesse (ROI) escolhidas para análise serão calculadas pela média das densidades de potência para os seguintes grupos de eletrodos: frontal (F7, F3, Fp1, Fz, Fp2, F4, F8), central (FC3, C3, FCz, Cz, C4, FC4), parietal (CP3, P3, CPz, Pz, CP4, P4)

,temporal (FT7, T3, TP7, T5, FT8, T4, TP8, T6) , occipital (O1, Oz, O2) e a banda sensório-motora. Depois de obter densidades de potência absolutas, a densidade de potência relativa será calculada dividindo os valores do eletrodo em cada uma das frequências analisadas pelos seus valores no espectro total de potência.

### 5.8.2. Estudo 2

A busca e análise dos artigos foi realizada de forma independente por dois revisores. Após os títulos e resumos dos estudos serem avaliados, aqueles que não apresentaram os critérios de elegibilidade foram excluídos, sendo as divergências resolvidas por um terceiro revisor. Os estudos que apresentaram os critérios pré-determinados tiveram seu texto completo adquirido para análise detalhada e extração de dados. Um arquivo de extração de dados eletrônicos foi criado para organizar os dados extraídos relevantes de cada estudo. Os dados extraídos pertencem aos dados demográficos dos participantes, bem como variáveis avaliadas e medidas utilizadas.

## 6. Técnicas e equipamentos utilizados

Estudo 1: O aparelho utilizado no estudo será o Therapy XT/DMC (Campinas, Brasil) com um comprimento de onda LASER vermelho ( $660 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ) e uma potência de saída de cerca de  $100 \text{ mW} \pm 20\%$ , com 6J por ponto.

Estudo 2: Fará parte da Revisão Sistemática estudos onde o público alvo tenha sido submetido a exames com aparelhos de RM , RMf e EEG

## 7. Descontinuidade do estudo

7.1. Estudo 1: A- Efeito adverso moderado (ou seja , desconfortável o suficiente para interferir com as atividades usuais do paciente ) ou grave ( significativo prejuízo das atividades habituais do paciente ou mesmo total deficiência e risco de vida ) durante a avaliação ou intervenção .

B- O participante retirar o consentimento em qualquer fase do estudo

7.2. Estudo 2: Desistência do autor

## 8. Planejamento Estatístico

### 8.1. Estudo 1:

#### 8.1.1. Estatística descritiva

Para elaboração do banco de dados, análise descritiva e analítica, será utilizado o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 14.0 for Windows. A normalidade das variáveis será verificada através da análise descritiva. Os resultados serão apresentados por meio de tabelas, gráficos e ou figuras; as variáveis categóricas expressas em valores absolutos e percentuais – n (%). As variáveis contínuas com distribuição normal serão expressas em média e desvio padrão ( $\pm DP$ ), e aquelas com distribuição assimétrica, em mediana e intervalo interquartil (IQ).

#### 8.1.2. Estatística inferencial

Para comparação do nível de dor entre os grupos sham e intervenção será utilizado o teste t de Student independente ou Mann-Whitney. Para avaliação do EEG antes e após a intervenção nos grupos, nível de dor antes e após a acupuntura a laser nos dois tipos de crianças falcêmicas (SC e SS), será utilizado o teste t de Student pareado ou Wilcoxon. A análise do EEG entre os grupos (crianças controle x crianças falcêmicas) será feito através do teste estatístico kruskal-wallis com p-valor. O nível de significância adotado será de 5%.

#### 8.1.3 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pela calculadora WINPEPI (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>). O comando selecionado foi de comparação de médias, considerando um desvio padrão de 2,62 e 2,22, obtidos no estudo de Moadad N et al, com uma diferença a ser detectada de 2 pontos na escala de dor, poder do teste de 80% e um nível de significância de 5% para uma hipótese bicaudal, necessitando de um  $n = 24$  para cada grupo (total 48).

8.2. Estudo 2: A categorização foi realizada separadamente para as mudanças positivas (por exemplo atividade BOLD aumentada vs. participantes controle) e as mudanças negativas (por exemplo, atividade BOLD diminuída em pacientes vs. participantes controle) / EEG (áreas com aumento da conectividade versus áreas com diminuição da conectividade).

## 9. Potenciais dificuldades durante a coleta

9.1. Estudo 1: Consideramos como armadilhas potenciais para este estudo o uso da hidroxiureia pelas crianças e o seu poder analgésico, reduzindo as queixas de dor nas consultas ambulatoriais. Além disso, precisamos considerar o cenário de pandemia e a dificuldade de aproximação com as crianças do estudo.

9.2. Estudo 2: A pequena quantidade de estudos e seus desenhos transversais limitam a afirmar que todas as alterações cerebrais encontradas em nosso estudo são consequência da dor nesta população específica. Além disso, é muito difícil agrupar crianças, adolescentes, adultos jovens e adultos jovens com DF com história de dor no mesmo estudo. Outra limitação está relacionada aos métodos de neuroimagem utilizados. A maioria dos estudos incluídos utilizou a ressonância magnética estrutural e funcional como método de investigação e apenas um estudo, com média de idade correspondente aos adultos jovens, utilizou EEG. Devido à heterogeneidade dos estudos, não foi possível realizar uma síntese quantitativa dos resultados dos estudos incluídos por meio de uma meta-análise.

## 10. Resultados

10.1. Estudo 1: Este protocolo iniciado em Julho / 2019 foi interrompido em Março /2020 em virtude do momento pandêmico . A liberação para o retorno ao laboratório e ambulatorios pediátricos aconteceu em Agosto/2022 e temos a previsão de finalização da coleta para Dezembro/2022 e término da análise e escrita para Dezembro/ 2023.

10.2. Estudo 2: De acordo com os critérios de pesquisa, identificamos inicialmente 685 estudos. Destes, 20 foram selecionados para análise após a leitura do resumo. Excluímos outros devido à presença dos critérios de exclusão ( faixa etária acima da proposta pelo estudo , não haver comparação entre a intensidade da dor entre os grupos ), deixando um total de cinco estudos que selecionamos para discussão. Informações bibliográficas sobre os artigos selecionados para revisão e os motivos para exclusão dos estudos estão disponíveis na Figura 1.



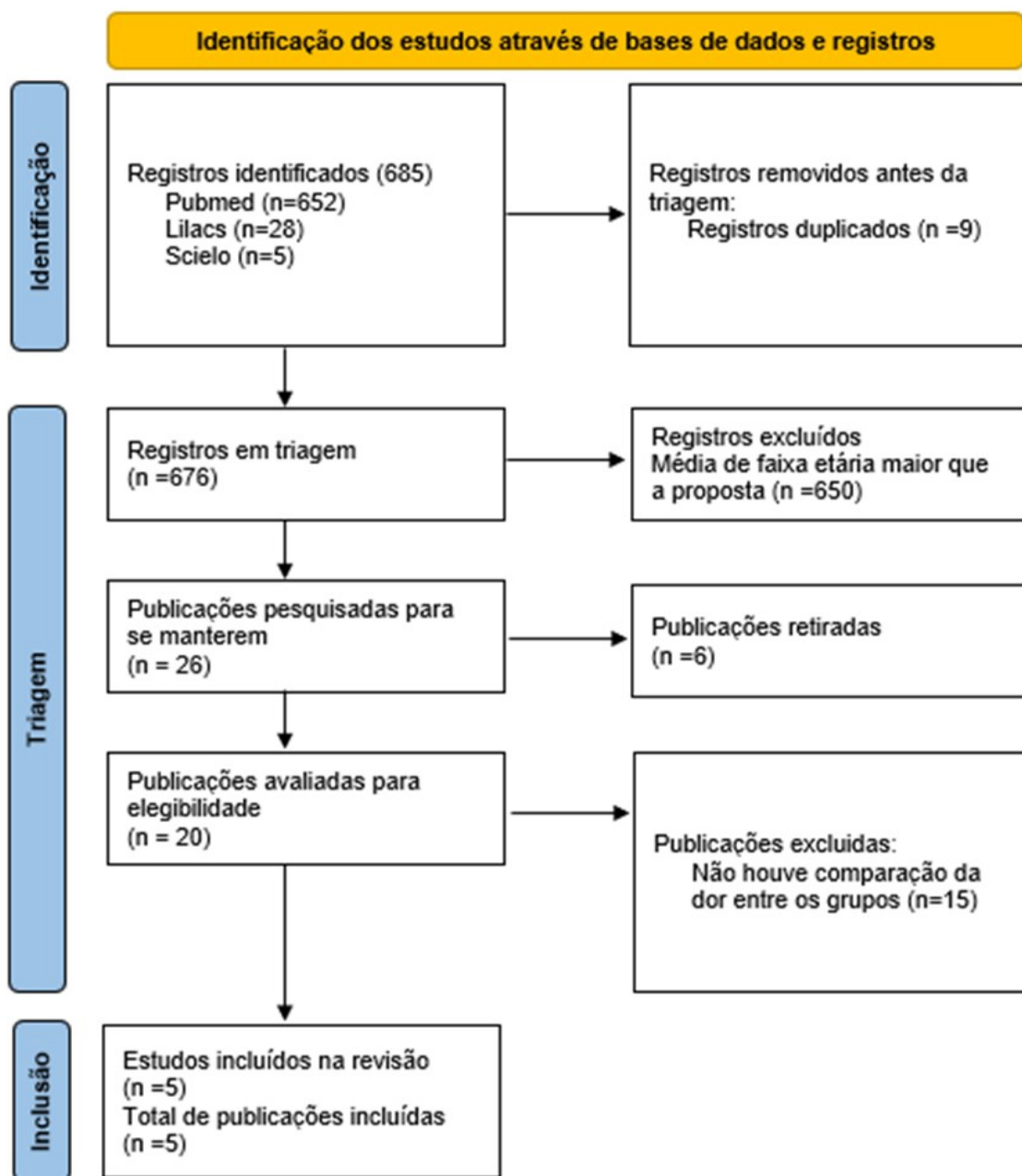


Figura 1. Fluxograma de buscas nas bases de dados

Os artigos elegíveis foram publicados entre 2009 e 2021 tendo o desenho dos cinco estudos de corte transversal ( 100 % ). A fonte de financiamento foi relatada em 100 % das citações. Com um tamanho de amostra não superior a 40 crianças no estudo, a média total de crianças com DF = 25,4 e o desvio padrão é de DP= 12,95.

No total, foram avaliadas 127 crianças , adolescentes e jovens adultos com DF e 44 controles. O tamanho da amostra de participantes com DF variou de 12 a 40 indivíduos. As meninas ( 64,5 %) foram avaliadas com mais frequência do que os meninos. Esses resultados são apresentados na Tabela 1.

O desenho experimental dos estudos mostra que a Ressonância Magnética Funcional (fMRI) foi a modalidade mais utilizada, correspondendo a 80 % dos estudos. Foi utilizado também o EEG, a Ecografia com Doppler Transcraniano TCD), Ressonância Magnética Estrutural (RM), e a angiografia por RM . Todos os estudos utilizaram a cobertura total do cérebro. Como covariáveis observou-se a idade, gênero, exames laboratoriais, quantidade de Hb ( hemoglobina ), correlação com Hb fetal, saturação de oxigênio (SatO2), número de transfusões, uso de hidroxiureia, avaliação cognitiva, número de internações nos últimos 12 meses, história de AVC, vasculopatia e eventos dolorosos, status econômico, qualidade de vida e tipo de DF.

Os autores propuseram diferenças em regiões cerebrais relacionadas ao processamento da dor (Tabela 3) entre os grupos controle e o grupo de crianças , adolescentes e jovens adultos falcêmicos em relação à conectividade e espessura cortical detalhadas na meta-análise a seguir (Quadro 1).

Tabela 1. Desenho experimental dos estudos incluídos e achados de neuroimagem

ESTUDO	MOSTRA	IDADE	GENERO	MODALIDADE	ESTIMULO/ LOCALIZAÇÃO	SINAL/técnica	PRINCIPAIS DESCOBERTAS
Colombhatti et al., 2016	DF (40) Controle (16)	DF (8,08 ± 2,83) Controle (9,98±2,8)	DF (21M, 19F) Controle (5M, 11F)	fMRI em estado de repouso com avaliação da DMN	Toda a extensão cerebral	BOLD/ICA	↑ conectividade no precuneus
Darbari et al., 2015	Dor baixa (14) Dor alta (8)	Dor baixa (17 [12–20]) Dor alta (18,5 [13–22])	Dor baixa (5M, 9F) Dor alta (2M, 6F)	fMRI em estado de repouso	Toda a extensão cerebral	BOLD/ICA	Participantes com dor mais intensa apresentaram ↑ conectividade do CCA dorsolateral/medial (rede pró-nociceptiva) a estruturas da Rede Modo Padrão (precuneus direito e lobo parietal inferior) Participantes com dor menos intensa/frequente apresentaram ↑ conectividade no córtex cingular subgenual e córtex somatosensorial (Rede Antinociceptiva)
Wang et al., 2021	DF (38)	11,45 ± 3,31	14M, 24F	MRI	Toda a extensão cerebral	Morfometria baseada em Voxel	O GMV do córtex cingulado anterior perigenual (CCA) foi negativamente associado à frequência de crises de dor; O subgrupo com crise/crise de dor no último ano apresentou ↓GMV giro supratemporal esquerdo do que o grupo sem crise de dor; Correlação negativa entre CCA pregenua, CCA subgenual e frequência de crises de dor.
Case 2019	DF (15), Controles (16)	Menos severos 21,4 ( ±5,7) Mais severos 21,7 ( ±6,3)	Menos severos 8F, 7M Mais severos 7F, 9M	EEG e fMRI	Toda a extensão cerebral	Grafs analise teorica	1. O grupo mais grave teve menor eficiência local e coeficiente de agrupamento em comparação com o grupo controle e o grupo menos severo. 2. Imagens de origem de EEG demonstraram que controles diferiram significativamente dos grupos de pacientes no beta1 3. Pacientes mais graves resultou da diminuição da aglomeração em todo o cérebro, incluindo regiões no córtex frontal, temporal, córtex parietal, córtex occipital e regiões subcorticais 4. Pacientes com DF demonstram comportamento de rede alterado em regiões relacionadas à memória, como o cerebelo, parahipocampo e córtex pré-frontal/cerebelo, parahipocampo, cortex pre frontal
Zimapsky 2017	12 DF, 12 controles	DF 22,8 (4,3) Controle 20,5 (4,6)	3 M 9 F	fMRI	Toda a extensão cerebral	BOLD/ICA	Anormalidades em pacientes com DF na rede somatosensorial do cérebro, saliência rede e rede de modo padrão durante um estado de repouso não estruturado

Abbreviations: ICA = Independent Component Anal

A Tabela 2 mostra os resultados da avaliação de qualidade e risco de viés para os estudos incluídos nesta revisão. As pontuações dos estudos variaram entre 8 e 9.

Tabela 2. Resultado da avaliação de qualidade dos estudos e risco de viés utilizando a Newcastle Ottawa Scale

ARTIGO	SELEÇÃO	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	RESULTADO	TOTAL
Collombati 2016	4	2	3	9
Darbari 2015	4	2	3	9
Wang 2021	4	1	3	8
Case 2019	4	1	3	8
Zumpsky 2017	4	2	3	9

Quadro 1 . Conectividade cerebral versus espessura cortical

ESTUDOS SOBRE ESPESSURA CORTICAL	ACHADOS
Wang 2021	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.Espessura do córtex cingulado anterior foi negativamente associado com crises frequentes de dor</li> <li>2.Diminuição da substância cinzenta no giro supratemporal esquerdo no grupo com dor</li> <li>3.Diminuição da substância cinzenta no parahipocampo</li> </ol>
Case 2019	1 .Diminuição da substancia branca e cinzenta comparado ao grupo controle
ESTUDOS SOBRE CONECTIVIDADE CEREBRAL	ACHADOS
Collombatti, 2016	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aumento da conectividade da Rede Modo Padrão no precuneus posterior em pacientes em comparação com controles</li> <li>2. Aumento da conectividade na Rede Modo Padrão na região pré frontal medial, em pacientes com coeficiente de inteligência verbal normal em comparação com controles</li> <li>3. Aumento da conectividade da Rede Modo Padrão , na região pré frontal direita , em pacientes com ressonância magnética normal em comparação com controles</li> <li>4. Aumento da conectividade na região calcarina posterior em pacientes com SaO2 de 97% em comparação com pacientes com maior SaO2 de oxigênio</li> </ol>
Darbari , 2016	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aumento da conectividade central em comparação com o grupo de baixa dor entre o córtex cingulado anterior dorsal e o precuneus D ; entre o córtex somatossensorial secundário e o precuneus esquerdo ; entre o lóbulo parietal inferior e o córtex cingulado médio ; entre o córtex insular posterior direito e o córtex somatossensorial primário direito</li> <li>2. A rede modo padrão mostrou maior conectividade negativa ( anti- correlação) com a ínsula anterior no grupo com dor baixa em comparação ao grupo com dor alta</li> <li>3. A rede saliencia menor conectividade negativa com o córtex cingulado anterior perigenual no grupo de baixa dor em comparação com o grupo de dor alta</li> <li>4. O grupo de dor baixa exibiu uma correlação negativa entre HbF%e conectividade entre o córtex somatossensorial secundário e o precuneus esquerdo</li> <li>5. O grupo de baixa dor teve uma correlação positiva entre o nível de conectividade entre a rede saliência e o córtex cingulado anterior perigenual e níveis de hemoglobina fetal</li> </ol>
Case 2019	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.Intensidade da dor relacionada a menor coeficiente de agrupamento e eficiencia local</li> <li>2.A imagem da fonte de EEG demonstrou que controles diferiram significativamente dos grupos de pacientes na banda beta1.</li> <li>3.Comportamento de rede alterado em regiões relacionadas à memória, como o cerebelo, parahipocampo e córtex pré-frontal</li> </ol>
Zempsy 2017	Alteração no precuneus e CCA além de outras regiões da rede modo padrão , saliencia e somatossensorial

Tabela 3. Regiões do cérebro com alteração da conectividade em crianças , adolescentes e jovens adultos com DF

REGIÃO CEREBRAL	Wang 2021	Case 2019	Colombatti 2016	Darbari 2015	Zempsy 2017
<b>Rede Modo Padrão</b>					
CÓRTEX CINGULAR MEDIAL					↓
CÓRTEX CINGULAR ANTERIOR	↓			↑	↑
PRECUNEUS DIREITO			↑	↑	↓
PRECUNEUS ESQUERDO			↑	↑	↓↑
GIRO ANGULAR ESQUERDO					↑
GIRO FRONTAL SUPERIOR ESQUERDO					↓↑
GIRO FRONTAL SUPERIOR DIREITO					↑
GIRO FRONTAL INFERIOR ESQUERDO					↓
GIRO FRONTAL MEDIAL ESQUERDO					↑
GIRO FRONTAL INFERIOR					↓
GIRO TEMPORAL MEDIAL DIREITA					↑
GIRO TEMPORAL MEDIAL ESQUERDO					↑
GIRO MEDIAL SUPERIOR DIREITO					↑
GIRO CALCARINO			↑		↑
PARAHIPOCAMPO		↓			
ÍNSULA DIREITA					↓
<b>Rede Saliência</b>				↑	
ÍNSULA ANTERIOR				↑	
CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR DORSAL				↑	
GIRO FRONTAL MEDIAL DIREITO					↓↑
GIRO FRONTAL INFERIOR ESQUERDO					↑
GIRO SUPRAMARGINAL DIREITO					↓

GIRO MEDIAL SUPERIOR ESQUERDO					↑
LÓBULO PARIETAL INFERIOR ESQUERDO				↑	↓
<b>Rede Somatossensorial</b>					
GIRO PRÉ CENTRAL ESQUERDO					↓
GIRO PRE CENTRAL DIREITO					↓
GIRO FRONTAL MEDIAL ESQUERDO					↑
GIRO FRONTAL INFERIOR/MEDIAL ESQUERDO					↑
GIRO SUPRAMARGINAL DIREITO					↑
OPÉRCULO ROLÂNDICO					↓
<b>DIPFC *</b>	↑	↓	↑		
<b>Cerebelo *</b>		↓			
<b>Substância Branca</b>		↓			
<b>Substância Cinzenta</b>	↓	↓			

Como achado secundário observamos que quanto maior a idade da criança , do adolescente com DF maior é a intensidade relatada de dor . Geralmente na adolescência há um aumento na frequência das crises dolorosas , maior tempo de hospitalização e aparecimento das dores crônicas.

## 11. Aspectos éticos

11.1. Estudo 1. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (UFBa), Brasil (registro CAAE 65613917.7.0000.0049, Parecer 3.847.214). Todos os responsáveis e crianças participantes da pesquisa terão que assinar um termo de consentimento adaptado ao seu conhecimento e aprovado pelo comitê de ética.

11.2. Estudo 2: Esta revisão foi previamente registrada no PROSPERO com o número 246716.

## Referências

- 1-Bandeira, Flavia M. G. C., et al. “Hidroxiuréia Em Pacientes Com Síndromes Falciformes Acompanhados No Hospital Hemope, Recife, Brasil.” *Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia*, vol. 26, no. 3, 2004, doi:10.1590/1516-84842004000300008
- 2-Bhatt RR et al. Chronic pain in children: structural and resting-state functional brain imaging within a developmental perspective. *Pediatr Res*. 2020 Dec;88(6):840-849. doi: 10.1038/s41390-019-0689-9. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31791045; PMCID: PMC7263945.
- 3-Baeumler, Petra Íris, et al. “High Temporal Summation of Pain Predicts Immediate Analgesic Effect of Acupuncture in Chronic Pain Patients—A Prospective Cohort Study.” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, 2019, doi:10.3389/fnins.2019.00498.
- 4-Brandow AM, DeBaun MR. Key Components of Pain Management for Children and Adults with Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018 Jun;32(3):535-550. doi: 10.1016/j.hoc.2018.01.014. PMID: 29729787; PMCID: PMC6800257.
- 5- Brasil. Agência Nacional da Vigilância Sanitária . Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes . Brasília,DF;2001.
- 6- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de condutas básicas na doença falciforme. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2002. 50 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- 7-Cabrera et al., Laser acupuntura con Helio-Neón en el tratamiento de pacientes traumatizados. *Rev. Cubana Med. Milit.*, v.31,p.5-12, 2002 .
- 8-Cançado, R et al. A doença falciforme no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto , v. 29, n. 3, p. 204-206, Sept .2007. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842007000300002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300002&lng=en&nrm=iso)>.access on 04 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842007000300002>).
- 9-Case, Michelle, et al. “Graph Theory Analysis Reveals How Sickle Cell Disease Impacts



- Neural Networks of Patients with More Severe Disease.” *NeuroImage: Clinical*, vol. 21, 2019, p. 101599., doi:10.1016/j.nicl.201
- 10-Champlin G et al. Progression of central nervous system disease from pediatric to young adulthood in sickle cell anemia. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021 Dec;246(23):2473-2479. doi: 10.1177/15353702211035778. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34407676; PMCID: PMC8649936
- 11-Chon TY, Mallory MJ, Yang J, Bublitz SE, Do A, Dorsher PT. Laser Acupuncture: A Concise Review. *Med Acupunct*. 2019 Jun 1;31(3):164-168. doi: 10.1089/acu.2019.1343. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31297170; PMCID: PMC6604908.
- 12-Darbari DS et al. Frequency of Hospitalizations for Pain and Association With Altered Brain Network Connectivity in Sickle Cell Disease. *J Pain*. 2015 Nov;16(11):1077-86. doi: 10.1016/j.jpain.2015.07.005. Epub 2015 Aug 18. PMID: 26291276; PMCID: PMC4986827.
- 13-Farrell AT et al. End points for sickle cell disease clinical trials: patient-reported outcomes, pain, and the brain. *Blood Adv*. 2019 Dec 10;3(23):3982-4001. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000882. PMID: 31809538; PMCID: PMC6963237.
- 14-Ferreira, Danielly Cunha Araújo, et al. “Effect of Laser Acupuncture and Auricular Acupressure in a Child with Trismus as a Sequela of Medulloblastoma.” *Acupuncture in Medicine*, vol. 32, no. 2, 2014, pp. 190–193., doi:10.1136/acupmed-2013-010484.
- 15-Friedrichsdorf SJ, Goubert L. Pediatric pain treatment and prevention for hospitalized children. *Pain Rep*. 2019 Dec 19;5(1):e804. doi: 10.1097/PR9.0000000000000804. PMID: 32072099; PMCID: PMC7004501.
- 16-Golianu, Brenda, et al. “Acupuncture for Pediatric Pain.” *Children*, vol. 1, no. 2, 2014, pp. 134–148., doi:10.3390/children1020134.
- 17-He, Wei, et al. “Effectiveness of Interstitial Laser Acupuncture Depends upon Dosage: Experimental Results from Electrocardiographic and Electrocorticographic Recordings.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013, pp. 1–4., doi:10.1155/2013/934783.
- 18- Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009 Sep 1;7(4):358-83. doi: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin. PMID: 20011653; PMCID: PMC2790317
- 19-Law D, McDonough S, Bleakley C, Baxter GD, Tumilty S. Laser acupuncture for treating musculoskeletal pain: a systematic review with meta-analysis. *J Acupunct Meridian Stud*. 2015 Feb;8(1):2-16. doi: 10.1016/j.jams.2014.06.015. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25660439.
- 20-Lin, Mu-Lien, et al. “Clinical Effects of Laser Acupuncture plus Chinese Cupping on the Pain and Plasma Cortisol Levels in Patients with Chronic Nonspecific Lower Back Pain: A Randomized Controlled Trial.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, 2017, pp. 1–7., doi:10.1155/2017/3140403.
- 21-Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG.

Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.* 2010 Nov-Dec;85(6):849-55. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0365-05962010000600011. PMID: 21308309.

Liu CF, Chien LW. Efficacy of acupuncture in children with asthma: a systematic review. *Ital J Pediatr.* 2015 Jul 7;41:48. doi: 10.1186/s13052-015-0155-1. PMID: 26149519; PMCID: PMC4491888.

23-Lopes T et al. Sick Cell Disease Chronic Joint Pain: Clinical Assessment Based on Maladaptive Central Nervous System Plasticity (December 9, 2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3745971> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3745971>

24- Martins, A., et al. O autocuidado para o tratamento de úlcera de perna falciforme: orientações de enfermagem. *Esc. Anna Nery* [online]. 2013, vol.17, n.4, pp. 755-763. ISSN 1414-8145. <http://dx.doi.org/10.5935/1414-8145.20130021>.

25-McCarty PJ et al. Resting State Functional Magnetic Resonance Imaging Elucidates Neurotransmitter Deficiency in Autism Spectrum Disorder. *J Pers Med.* 2021 Sep 28;11(10):969. doi: 10.3390/jpm11100969. PMID: 34683111; PMCID: PMC8537605.

26-MacPherson H, Altman DG, Hammerschlag R, Youping L, Taixiang W, et al. (2010) Revised STAndards for Reporting Interventions in Clinical Trials of Acupuncture (STRICTA): Extending the CONSORT Statement. *PLoS Med* 7(6): e1000261. doi:10.1371/journal.pmed.1000261

27-McVoy M et al. A systematic review of quantitative EEG as a possible biomarker in child psychiatric disorders. *Psychiatry Res.* 2019 Sep;279:331-344. doi: 10.1016/j.psychres.2019.07.004. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31300243.

28-Moadad N, Kozman K, Shahine R, Ohanian S, Badr LK. Distraction Using the BUZZY for Children During an IV Insertion. *J Pediatr Nurs.* 2016 Jan-Feb;31(1):64-72. doi: 10.1016/j.pedn.2015.07.010. Epub 2015 Sep 26. PMID: 26410385.

29-Moustafa, Yousry, et al. “Assessment of Allergic Rhinitis among Children after Low-Level Laser Therapy.” *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol. 7, no. 12, 2019, pp. 1968–1973., doi:10.3889/oamjms.2019.477.

30- OBO, Clarisse; MARRA, Vera Neves and SILVA, Regina Maria G.. Crises dolorosas na doença falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2007, vol.29, n.3, pp. 247-258. ISSN 1806-0870. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842007000300011>.

31-Pecker LH, Lanzkron S. Sick Cell Disease. *Ann Intern Med.* 2021 Jan;174(1):ITC1-ITC16. doi: 10.7326/AITC202101190. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33428443.

32-Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain.* 2020 Sep 1;161(9):1976-1982. doi:

10.1097/j.pain.0000000000001939. PMID: 32694387; PMCID: PMC7680716.

33-Reeves, Sarah L., et al. "Hydroxyurea Initiation Among Children With Sickle Cell Anemia." *Clinical Pediatrics*, vol. 58, no. 13, 2019, pp. 1394–1400., doi:10.1177/0009922819850476.

34-Richardson K, Sweatt N, Tran H, Apprey V, Uthayathas S, Taylor R and Gupta K (2020) Significant Quantitative Differences in Orexin Neuronal Activation After Pain Assessments in an Animal Model of Sickle Cell Disease. *Front. Mol. Biosci.* 7:5. doi: 10.3389/fmolb.2020.00005

35-Saramba, Manou Irmina, et al. "Analgesic Management of Uncomplicated Acute Sickle-Cell Pain Crisis in Pediatrics: a Systematic Review and Meta-Analysis." *Jornal De Pediatria*, vol. 96, no. 2, 2020, pp. 142–158., doi:10.1016/j.jpmed.2019.05.004.

36-Sá KN, et al. Prevalência de dor lombar crônica na população da cidade de Salvador. *Rev Bras Ortop.* 2008; 43(3): 96-102. DOI:[10.1590/S0102-36162008000200007](https://doi.org/10.1590/S0102-36162008000200007)

37-Shaffer B. Scientific basis of laser energy. *Clin Sports Med.* 2002 Oct;21(4):585-98. doi: 10.1016/s0278-5919(02)00007-8. PMID: 12489292.

38-Silva , Michelle C and Shimauti, Eliana L.T. "Eficácia e Toxicidade Da Hidroxiuréia Em Crianças Com Anemia Falciforme." *Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia*, vol. 28, no. 2, 2006, doi:10.1590/1516-84842006000200016.

39-Sydnor VJ et al. Neurodevelopment of the association cortices: Patterns, mechanisms, and implications for psychopathology. *Neuron.* 2021 Sep 15;109(18):2820-2846. doi: 10.1016/j.neuron.2021.06.016. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34270921; PMCID: PMC8448958

40-Thorp SL, Suchy T, Vadivelu N, Helander EM, Urman RD, Kaye AD. Functional Connectivity Alterations: Novel Therapy and Future Implications in Chronic Pain Management. *Pain Physician.* 2018 May;21(3):E207-E214. PMID: 29871376.

41.Zeng YJ, et al. Laser acupuncture-induced analgesic effect and molecular alterations in an incision pain model: a comparison with electroacupuncture-induced effects. *Lasers Med Sci.* 2018 Feb;33(2):295-304. doi: 10.1007/s10103-017-2367-7. Epub 2017 Nov 4. PMID: 29103083; PMCID: PMC58032

## Trials

### APPLICATION OF LASER ACUPUNCTURE IN THE TREATMENT OF PAIN IN CHILDREN WITH FALCIFORM DISEASE: PROTOCOL OF A BLIND, AND RANDOMIZED, PARALLEL, CLINICAL TRIAL

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>					
<b>Full Title:</b>	APPLICATION OF LASER ACUPUNCTURE IN THE TREATMENT OF PAIN IN CHILDREN WITH FALCIFORM DISEASE: PROTOCOL OF A BLIND, AND RANDOMIZED, PARALLEL, CLINICAL TRIAL				
<b>Article Type:</b>	Study protocol				
<b>Funding Information:</b>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>PRONEM (04.902.299/0001-20)</td> <td>PhD Rita Lucena</td> </tr> </table>	PRONEM (04.902.299/0001-20)	PhD Rita Lucena		
PRONEM (04.902.299/0001-20)	PhD Rita Lucena				
<b>Abstract:</b>	<p>Sickle cell disease (SCD) is a highly prevalent genetic disease in Brazil. Its clinical complications are mainly related to vascular occlusions, causing musculoskeletal and thoraco-abdominal pain, and chronic involvement of multiple organs and systems. The conventional treatment of chronic pain (CP) associated with SCD is essentially pharmacological and, not infrequently, is accompanied by adverse effects.</p> <p><b>OBJECTIVE:</b> The aim of the present study is to verify the effectiveness of LASER acupuncture as a pain control method in children with SCD. <b>METHOD:</b> A randomized, blinded controlled clinical trial will be conducted in which 48 children with SCD with CP will be submitted to a LASER acupuncture session in order to verify its analgesic efficacy. The main outcome of the study will be the pain intensity, assessed using the Wong Baker scale. Another 24 children without a previous diagnosis of SCD and without a history of pain will serve as the study's control group. Quantitative electroencephalography ( EEGq) will be used as a secondary outcome of the study. This project is registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials - REBEC (Register Number: RBR-9jp5sj).</p> <p><b>KEY WORDS:</b> sickle cell disease, pain, children, LASER acupuncture, Wong Baker scale</p> <p><b>FUNDING STATEMENT:</b> This project is funded by PRONEM</p>				
<b>Corresponding Author:</b>	Abrahão Fontes Baptista, PhD Federal University of Bahia Salvador, Bahia BRAZIL				
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	abraham.baptista@gmail.com				
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>					
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Federal University of Bahia				
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>					
<b>First Author:</b>	Abrahão Fontes Baptista, PhD				
<b>First Author Secondary Information:</b>					
<b>Order of Authors:</b>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Abrahão Fontes Baptista, PhD</td> </tr> <tr> <td>Carla Marques</td> </tr> <tr> <td>Giovanna Suzarth</td> </tr> <tr> <td>Rita Lucena</td> </tr> </table>	Abrahão Fontes Baptista, PhD	Carla Marques	Giovanna Suzarth	Rita Lucena
Abrahão Fontes Baptista, PhD					
Carla Marques					
Giovanna Suzarth					
Rita Lucena					
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>					
<b>Opposed Reviewers:</b>					

Additional Information:	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
Are you submitting this manuscript to a Thematic Series?	No

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## APPLICATION OF LASER ACUPUNCTURE IN THE TREATMENT OF PAIN IN CHILDREN WITH FALCIFORM DISEASE: PROTOCOL OF A BLIND, AND RANDOMIZED, PARALLEL, CLINICAL TRIAL

**Carla Marques, BPhysio<sup>1</sup>; Giovanna Suzart, BPhysio<sup>2</sup>; Katia Nunes Sá<sup>1</sup>; Rita Lucena, PhD<sup>2</sup>; Abrahão Fontes Baptista, BPhysio, PhD<sup>1,3,4</sup>**

1. Graduate Program in Medicine and Health, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil
2. Graduate Program in Medicine and Health, Federal University of Bahia , Salvador, Brazil
3. Center for Mathematics, Computation and Cognition, Federal University of ABC, São Bernardo do Campo, Brazil
4. Laboratory of Medical Investigations 54 (LIM-54), São Paulo University, São Paulo, Brazil

### ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a highly prevalent genetic disease in Brazil. Its clinical complications are mainly related to vascular occlusions, causing musculoskeletal and thoraco-abdominal pain, and chronic involvement of multiple organs and systems. The conventional treatment of chronic pain (CP) associated with SCD is essentially pharmacological and, not infrequently, is accompanied by adverse effects. **OBJECTIVE:** The aim of the present study is to verify the effectiveness of LASER acupuncture as a pain control method in children with SCD. **METHOD:** A randomized, blinded controlled clinical trial will be conducted in which 48 children with SCD with CP will be submitted to a LASER acupuncture session in order to verify its analgesic efficacy. The main outcome of the study will be the pain intensity, assessed using the Wong Baker scale. Another 24 children without a previous diagnosis of SCD and without a history of pain will serve as the study's control group. Quantitative electroencephalography ( EEGq) will be used as a secondary outcome of the study. This project is registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials - REBEC (Register Number: RBR-9jp5sj).

**KEY WORDS:** sickle cell disease, pain, children, LASER acupuncture, Wong Baker scale

## INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is multisystemic and debilitating. In it, the hemoglobin gene has a mutation that causes an abnormal polymerization of the red cells, making them sickle-shaped (Pecker and Lanzkron 2021). This structural feature facilitates blood vessel obstruction, causing vaso-occlusive crises that impair the oxygen supply to organs and viscera, resulting in target organ damage and recurrent acute pain and chronic pain (Pecker and Lanzkron 2021). Most children experience at least one pain crisis / year and these crises have significant negative impacts (Reeves et al 2019). The presence of long-term pain can affect global brain activity (Case et al 2019). The lack of inhibitory control in the dorsal horn of the spinal cord due to both local and supraspinal dysfunction causes phenotypic changes in A $\beta$  fibers specialized in the conduction of non-painful stimuli, favoring central sensitization (Lopes et al 2021).

Despite an in-depth understanding of acute sickle cell pain, relieving it remains a major challenge in children. Most episodes of pain in SCD are controlled at home following the action plan of the World Health Organization (WHO) analgesic ladder for pain control (Brandow and Debaun 2018). This ladder includes the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), opioids, hydration, common painkillers, adjuvant medications and with a recent tendency to dissociative anesthetics (Saramba et al 2020). However, although this model of analgesia is widely recommended, in practice opioids are currently the basis for the treatment of pain attacks in sickle cell disease children (Brandow and Debaun 2018). However, the use of chronic opioids in SCD can negatively affect organ systems and lead to the development of opioid tolerance or opioid-induced hyperalgesia, which can lead in the long term to severe adverse effects and decreased satisfactory pain control (Richardson et al 2020).

Another frequent alternative for the treatment of pain in SCD is the use of hydroxyurea, a medication that increases the amount of fetal hemoglobin in the blood (Reeves et al

1  
2  
3 2019). According to the data presented by Bandeira et al (2004), patients between  
4 seven and 17 years of age had a good clinical response with hydroxyurea treatment,  
5 including a reduction in the number of hospitalizations for painful episodes and the need  
6 for transfusion. Although effective, this approach also has disadvantages. Adverse  
7 reactions caused by hydroxyurea include myelosuppression, gastrointestinal  
8 disturbance, skin rash, migraine, teratogenic potential and possible carcinogenesis  
9 (Silva and Shimauti 2006). There are also reports of myelotoxicity, mainly  
10 thrombocytopenia and neutropenia, during the use of the medication, however it is  
11 mostly reversible after drug withdrawal (Silva and Shimauti 2006).  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 Thus, despite being useful, the efficacy of pharmacological analgesia is variable for pain  
21 control (Saramba et al 2020). An interdisciplinary rehabilitation approach including  
22 physical therapy, psychological treatment and integrative techniques has been shown to  
23 be effective in improving pain control in SCD (Friedrichsdorf and Goubert 2019).  
24 Acupuncture was considered useful and can be of clinical value in a multidisciplinary  
25 treatment program (Golianu et al 2014). It involves the stimulation of specific points  
26 located along the meridian lines corresponding to the flow of energy through the body  
27 that can be traditionally stimulated through fine needles, evolving to pressure  
28 application, use of electric current or low intensity LASER to stimulate those points -  
29 LASER acupuncture (LA) (Moustafa et al 2019). The acupuncture point irradiated by  
30 the LASER needs to receive enough energy to cause the physiological effect at the  
31 cellular level, based on the broader principle of photobiomodulation (Law et al 2015),  
32 which uses photons to stimulate the body's biological formation (Ferreira et al 2014) .  
33 The chemical energy within the cell can then be converted into the form of adenosine  
34 triphosphate, which leads to pain relief and cell proliferation after absorption of photonic  
35 energy (Lin et al 2017). The worldwide association of LASER therapy recommends a  
36 radiant power output of 5-500 mW, with an appropriate clinical window using 780-860  
37 nm (Zeng et al 2017). Many studies report positive results using the appropriate clinical  
38 dosage suggested by Baxter et al in their systematic review of a minimum power of 10  
39 mW and an energy dose of at least 0.5 J per point (Law et al 2015).  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3 The effects on neurovegetative responses in rats happened with 20 minutes of  
4 stimulation, but not 10 and 30 minutes (He et al 2013). LA has already been shown to  
5 be effective in treating children with pain by reducing the intensity and number of  
6 headaches, reducing vomiting crises in the postoperative period, reducing the duration  
7 of morphine therapy, and hospital stay in infants with neonatal withdrawal syndrome (He  
8 et al 2013). LA could be an option for pain control in SCD, provoking less suffering as it  
9 does not require the use / insertion of needles ( quite useful for treatment in children),  
10 but little is known about its effectiveness in this condition. As far as we know, there was  
11 only one study evaluating the use of traditional acupuncture in the sickle cell population  
12 where the authors concluded that there was an average pain reduction of 2.1 points  
13 immediately after acupuncture (Lu et al 2014). Thus, this study will be carried out to  
14 evaluate the effectiveness of pain reduction in children with SCD submitted to LA  
15 acupuncture.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

## 36 I OBJECTIVES

### 37 I.1. GENERAL:

38  
39  
40  
41  
42  
43 To analyze the effectiveness of LA in the treatment of pain in children with SCD  
44  
45  
46

### 47 I.2-SECONDARY OBJECTIVE

48  
49  
50  
51 A) Check if the LA triggers changes detected in quantitative electroencephalography  
52 that may be related to the change in pain intensity  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## II - HYPOTHESES:

A) LA is effective in controlling pain in children with SCD;

B) The effectiveness of LA in controlling pain is related to changes in electroencephalographic activity.

## III. CASUISTICS, MATERIALS AND METHODS

### III.1. Study design

This is a double-blind, randomized, parallel clinical trial. Randomization will take place through the use of a randomization software (randomization.com), and only the assistant researcher will have access to this information.

### III.2. Reference population

Children from the Pediatric Hematology Outpatient Clinic of the Professor Edgard Santos University Hospital, and the Sickle Cell Disease Outpatient Clinic of the Carlos Gomes Multicentre, Bahia, Brazil.

### III.3. Characteristics of the study population

Children diagnosed with SCD, and in CP at the last hematological consultation.

### III.4. Inclusion and exclusion criteria

Children from six to 12 years old, of any gender, with SCD confirmed by laboratory exam (sickling test or hemoglobin electrophoresis), report of CP complaint in the last hematological consultation (s) and whose responsible agreed to sign the Free and Informed Consent Form. The control group will be composed by healthy children paired by sex and age with the SCD group. This group will be used only to compare brain EEG activity between SCD and healthy participants. The use of analgesics will not prevent the inclusion of the participant in the study, but any change in the intake regimen will be documented.

1  
2  
3 The presence of a previous history of fracture for a year or less, a previous history of  
4 osteomyelitis, rheumatic fever, rheumatoid arthritis, leukemia, malignancy, patients with  
5 cerebral palsy or regular use of opioids will be established as non-inclusion criteria.  
6  
7  
8

### 9 10 III.5. Groups studied

11 The population will be divided into three groups, the first being the control group with  
12 healthy children (n=24), the second group with children with SCD submitted to LA  
13 (n=24), and the third group of children with SCD who will receive simulated LA (SHAM)  
14 (n=24). Data of the first group will be used to compare brain activity between healthy  
15 and sickle cell disease children.  
16  
17  
18  
19  
20  
21

### 22 III.6. Variables

23 The study will have as variables: a) Sociodemographic data: age, sex, age at diagnosis;  
24 b) Clinics: Estimates of the degree of pain using the Wong Baker scale at different times  
25 of the study, as well as the doses, active substances and frequencies of the medications  
26 used, results of previous Hb electrophoresis tests, known comorbidities, history of  
27 hospitalizations, use hydroxyurea and blood transfusion history. Participants will be  
28 assessed by the second author of the study, who is a pediatric physiotherapist and was  
29 extensively trained by the first author, who is also a pediatric physiotherapist and  
30 acupuncturist with more than 20 years of experience.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

### 40 III.7. Control of confounding variables to control loss bias

41 To control the loss bias, three more subjects in each group will be inserted in the study,  
42 providing for dropouts. To prevent adherence bias, the subjects will be blinded to the  
43 intervention group. Allocation concealment will be guaranteed through the use of  
44 sealed envelopes containing the group to which each child will be allocated. To control  
45 the measurement bias, specifically the observation bias, the subjects will be interviewed  
46 by two researchers only, who will undergo training to standardize the clinical evaluation,  
47 using previously structured questions. Diagnostic bias will be avoided by using a  
48 validated pain assessment instrument, and with good levels of reliability. To minimize  
49 the detection bias, the diagnostic standards for patient selection will be standardized  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3 through an interview during the hematological consultation where the child must be  
4 reporting pain. The variables collected will be of high logical validity, however some are  
5 under the influence of a false statement. Possible confounding variables will be  
6 excluded by the exclusion criteria. SHAM procedure will be guaranteed by the use of  
7 proper protection goggles by the participants, which do not allow them to see if the  
8 LASER dispositive is turned on or off. The procedure will be performed into a proper  
9 chamber, where only the investigator and the participant, preventing the parents to see  
10 if the procedure is actually active or SHAM. LASER does not heat or provoke any skin  
11 sensations, which allows the SHAM procedure to be effective.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

21 III.8. Study risks: LASER irradiation to the eyes may provoke damage. To prevent it,  
22 participants and the researcher will be using protective glasses.  
23  
24

### 25 III.9. Study steps 26

#### 27 III.9.1- Sample capture at the referenced institutions 28

29 Children will be recruited after consenting to the Pediatric Hematology Outpatient Clinic  
30 of the Magalhães Neto-HUPES Outpatient Clinic and to the Specialized Outpatient  
31 Clinic for Sickle Cell Disease of the Carlos Gomes Health Center, Bahia, Brazil.  
32  
33  
34  
35  
36  
37

#### 38 III.9.2. Completion of the Wong Baker Scale 39

40 The completion of the scale before and after the application of the LA will be carried out  
41 taking into account the interviewees' opinion regarding the discomfort felt. Children  
42 should identify themselves with one of the images on the six cards presented, ranging  
43 from a smile to facial expressions of sadness and crying, representing the classification  
44 of pain behavior.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

#### 52 III.9.3-Study Randomization 53

54 The randomization of the children in the study will be carried out previously using the  
55 software randomization.com.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

#### III.9.4-Performing LASER Acupuncture

Acupuncture sessions will be performed with the patient seated, wearing light clothing and protective glasses. During the session, children will be asked to remain as quiet and relaxed as possible. The technique will be performed by an experienced acupuncturist with 10 years of experience in Traditional Chinese Medicine. The choice of acupoints that will conduct the so-called energy treatment according to Traditional Chinese Medicine (TCM) will be carried out observing usual parameters such as pulse, aspect of the tongue, psychological and physiological information. The choice of acupuncture points will be given following the Acupuncture Consort (MacPherson et al 2010), identifying each individual as unique. The points in this practice will be prescribed according to the patient's condition at a given time but following the choice of the points meridian according to the location of the pain through its Luo points, ashi points and through the energetic physiology of the pathology that in the case of sickle cell disease is identified as Xue Deficiency and Free Flow interrupted as suggested by Baeumler. Participating children diagnosed with DF will undergo a 20-minute acupuncture session, with 6J of power in each acupoint planned according to the group in which they are included.

#### III.9.5- Electroencephalographic evaluation

The relative power density obtained by the electroencephalogram will be measured before and after the intervention. An electroencephalograph (EEG Brainet 36, EMSA, Brazil) with 30 electrodes arranged according to the 10/20 electroencephalography system will be used in the following electrode locations: F7 T3 T5 Fp1 F3 C3 P3 O1 F8 T4 T6 Fp2 F4 C4 P4 O2 Fz Cz Pz Oz FT7 FT8 TP7 CP3 FC3 CPz FCz CP4 FC4 TP8. EEG data will be collected at a sampling rate of 600 Hz and referenced to the Cz channel. The impedance will be kept below 5 KOhm for all electrodes and the recording environment will be kept in soft light and protected by a Faraday cage. Participants will

1  
2  
3 be instructed to sit comfortably in a chair , keeping their eyes open while recording the  
4 EEG, for five minutes.

5  
6 Preprocessing of EEG data will be done using MATLAB version 2015 and the EEGLab  
7 toolbox version 14. The signals will be filtered offline with a bandwidth between 0.5 and  
8 45 Hz. EEG data will be segmented at times of 1.71 s to allow an analysis of power  
9 densities at frequencies ranging from 1.2 to 30 Hz. EEG artifacts with minimum  
10 amplitude below -750 or maximum amplitude above 750  $\mu$ V will be rejected using a  
11 semiautomatic protocol. EEG data with more than 50% of rejected times will be  
12 excluded from further analysis. After the artifact rejection protocol, all EEG data will be  
13 adjusted to have the same number of epochs.

14  
15 The power density will be calculated by the rapid Fourier transform in each epoch and  
16 electrodes, separately for each participant. The average power densities will be grouped  
17 into delta (1.2-3.5 Hz), theta (4-7 Hz), alpha (8-12 Hz) and beta (13-30 Hz) bands. The  
18 regions of interest (ROI) chosen for analysis will be calculated by averaging the power  
19 densities for the following groups of electrodes: frontal (F7, F3, Fp1, Fz, Fp2, F4, F8),  
20 central (FC3, C3, FCz, Cz, C4, FC4), parietal (CP3, P3, CPz, Pz, CP4, P4), temporal  
21 (FT7, T3, TP7, T5, FT8, T4, TP8, T6), occipital (O1, Oz, O2) and the sensorimotor  
22 band. After obtaining absolute power densities, the relative power density will be  
23 calculated by dividing the electrode values at each of the frequencies analyzed by their  
24 values in the total power spectrum.

#### 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 IV- Techniques and equipment

41 The device used in the study will be the Therapy XT (DMC,Campinas, Brazil) with a red  
42 LASER wavelength (660 nm  $\pm$  10 nm) and an output power of about 100 mW  $\pm$  20%,  
43 with 6J per point.  
44  
45  
46  
47  
48

#### 49 V- Discontinuity of the study

50 A- Moderate adverse effect (that is, uncomfortable enough to dismiss the patient's usual  
51 activities) or severe (significant impairment of usual activities of the patient or even total  
52 disability and risk of life) during the evaluation or intervention.  
53  
54

55 B- The participant withdraws consent at any stage of the study  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## VI Statistical Planning

### VI.1-Descriptive statistics

For the elaboration of the database, descriptive and analytical analysis, the software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 14.0 for Windows will be used. The normality of the variables will be verified through descriptive analysis. The results will be presented through tables, graphs and or figures; categorical variables expressed in absolute and percentage values - n (%). Continuous variables with normal distribution will be expressed as mean and standard deviation ( $\pm$  SD), and those with asymmetric distribution, as median and interquartile range (IQ).

### VI.2- Inferential statistics

To compare the level of pain between the sham and intervention groups, the independent Student t test or Mann-Whitney test will be used . To assess the EEG before and after the intervention in the groups, level of pain before and after laser acupuncture in the two types of sickle cell children (SC and SS), the paired Student's t test or Wilcoxon will be used. The analysis of the EEG between the groups (control children x sickle cell children) will be done through the kruskal-wallis statistical test with p-value. The level of significance adopted will be 5%.

### VI.3 Sample calculation

The sample size was calculated using the WINPEPI calculator (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>). The command selected was to compare means, considering a standard deviation of 2.62 and 2.22, obtained in the study by Moadad N et al, with a difference to be detected of 2 points on the pain scale,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

test power of 80 % and a significance level of 5% for a two-tailed hypothesis, requiring an n = 24 for each group (total 48).

#### VII. Potential difficulties during collection

We consider potential pitfalls for this study to be the use of hydroxyurea by children and its analgesic power, reducing pain complaints in outpatient consultations. In addition, we need to consider the pandemic scenario and the difficulty of approaching the children in the study.

#### VIII. Ethical aspects

This project was ethically approved in the Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Federal University of Bahia, Brazil (registration CAAE 65613917.7.0000.0049, Parecer 3.847.214). All parents and children will sign an informed consent adapted to their understanding and approved by the ethical committee.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Golianu, Brenda, et al.** "Acupuncture for Pediatric Pain." *Children*, vol. 1, no. 2, 2014, pp. 134–148., doi:10.3390/children1020134.

**He, Wei, et al.** "Effectiveness of Interstitial Laser Acupuncture Depends upon Dosage: Experimental Results from Electrocardiographic and Electrocuticographic Recordings." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013, pp. 1–4., doi:10.1155/2013/934783.

**Law D, McDonough S, Bleakley C, Baxter GD, Tumilty S.** Laser acupuncture for treating musculoskeletal pain: a systematic review with meta-analysis. *J Acupunct Meridian Stud.* 2015 Feb;8(1):2-16. doi: 10.1016/j.jams.2014.06.015. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25660439.

**Lin, Mu-Lien, et al.** "Clinical Effects of Laser Acupuncture plus Chinese Cupping on the Pain and Plasma Cortisol Levels in Patients with Chronic Nonspecific Lower Back Pain: A Randomized Controlled Trial." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, 2017, pp. 1–7., doi:10.1155/2017/3140403.

**MacPherson H, Altman DG, Hammerschlag R, Youping L, Taixiang W, et al.** (2010) Revised Standards for Reporting Interventions in Clinical Trials of Acupuncture (STRICTA): Extending the CONSORT Statement. *PLoS Med* 7(6): e1000261. doi:10.1371/journal.pmed.1000261

**Moadad N, Kozman K, Shahine R, Ohanian S, Badr LK.** Distraction Using the BUZZY for Children During an IV Insertion. *J Pediatr Nurs.* 2016 Jan-Feb;31(1):64-72. doi: 10.1016/j.pedn.2015.07.010. Epub 2015 Sep 26. PMID: 26410385.

**Moustafa, Yousry, et al.** "Assessment of Allergic Rhinitis among Children after Low-Level Laser Therapy." *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol.

## References

**Bandeira, Flavia M. G. C., et al.** "Hidroxiuréia Em Pacientes Com Síndromes Falciformes Acompanhados No Hospital Hemope, Recife, Brasil." *Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia*, vol. 26, no. 3, 2004, doi:10.1590/1516-84842004000300008

**Baumler, Petra Iris, et al.** "High Temporal Summation of Pain Predicts Immediate Analgesic Effect of Acupuncture in Chronic Pain Patients—A Prospective Cohort Study." *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, 2019, doi:10.3389/fnins.2019.00498.

**Brandow AM, DeBaun MR.** Key Components of Pain Management for Children and Adults with Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018 Jun;32(3):535-550. doi: 10.1016/j.hoc.2018.01.014. PMID: 29729787; PMCID: PMC6800257.

**Case, Michelle, et al.** "Graph Theory Analysis Reveals How Sickle Cell Disease Impacts Neural Networks of Patients with More Severe Disease." *NeuroImage: Clinical*, vol. 21, 2019, p. 101599., doi:10.1016/j.nicl.201

**Chon TY, Mallory MJ, Yang J, Bublitz SE, Do A, Dorsher PT.** Laser Acupuncture: A Concise Review. *Med Acupunct.* 2019 Jun 1;31(3):164-168. doi: 10.1089/acu.2019.1343. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31297170; PMCID: PMC6604908.

**Ferreira, Danielly Cunha Araújo, et al.** "Effect of Laser Acupuncture and Auricular Acupressure in a Child with Trismus as a Sequela of Medulloblastoma." *Acupuncture in Medicine*, vol. 32, no. 2, 2014, pp. 190–193., doi:10.1136/acupmed-2013-010484.

**Friedrichsdorf SJ, Goubert L.** Pediatric pain treatment and prevention for hospitalized children. *Pain Rep.* 2019 Dec 19;5(1):e804. doi: 10.1097/PR9.0000000000000804. PMID: 32072099; PMCID: PMC7004501.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3 7, no. 12, 2019, pp. 1968–1973., doi:10.3889/oamjms.2019.477.  
4  
5

6 **Pecker LH, Lanzkron S.** Sickle Cell Disease. *Ann Intern Med.* 2021  
7 Jan;174(1):ITC1-ITC16. doi: 10.7326/AITC202101190. Epub 2021 Jan 12. PMID:  
8 33428443.  
9

10  
11  
12  
13 **Reeves, Sarah L., et al.** “Hydroxyurea Initiation Among Children With Sickle Cell  
14 Anemia.” *Clinical Pediatrics*, vol. 58, no. 13, 2019, pp. 1394–1400.,  
15 doi:10.1177/0009922819850476.  
16  
17

18  
19  
20 **Richardson K, Sweatt N, Tran H, Apprey V, Uthayathas S, Taylor R and Gupta K (2020)**  
21 Significant Quantitative Differences in Orexin Neuronal Activation After Pain Assessments in an  
22 Animal Model of Sickle Cell Disease. *Front. Mol. Biosci.* 7:5. doi: 10.3389/fmolb.2020.00005  
23  
24

25  
26  
27 **Saramba, Manou Irmira, et al.** “Analgesic Management of Uncomplicated Acute  
28 Sickle-Cell Pain Crisis in Pediatrics: a Systematic Review and Meta-Analysis.” *Jornal*  
29 *De Pediatria*, vol. 96, no. 2, 2020, pp. 142–158., doi:10.1016/j.jpmed.2019.05.004.  
30  
31

32  
33  
34 **Silva , Michelle C and Shimauti, Eliana L.T.** “Eficácia e Toxicidade Da Hidroxiuréia  
35 Em Crianças Com Anemia Falciforme.” *Revista Brasileira De Hematologia e*  
36 *Hemoterapia*, vol. 28, no. 2, 2006, doi:10.1590/1516-84842006000200016.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

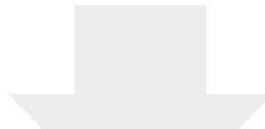
Ethical Approval Document

Click here to access/download

**Ethical Approval Document**

PB\_PARECER\_CONSUBSTANCIADO\_CEP\_3847214\_  
E4.pdf

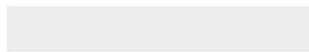
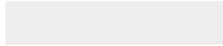
Funding Documentation



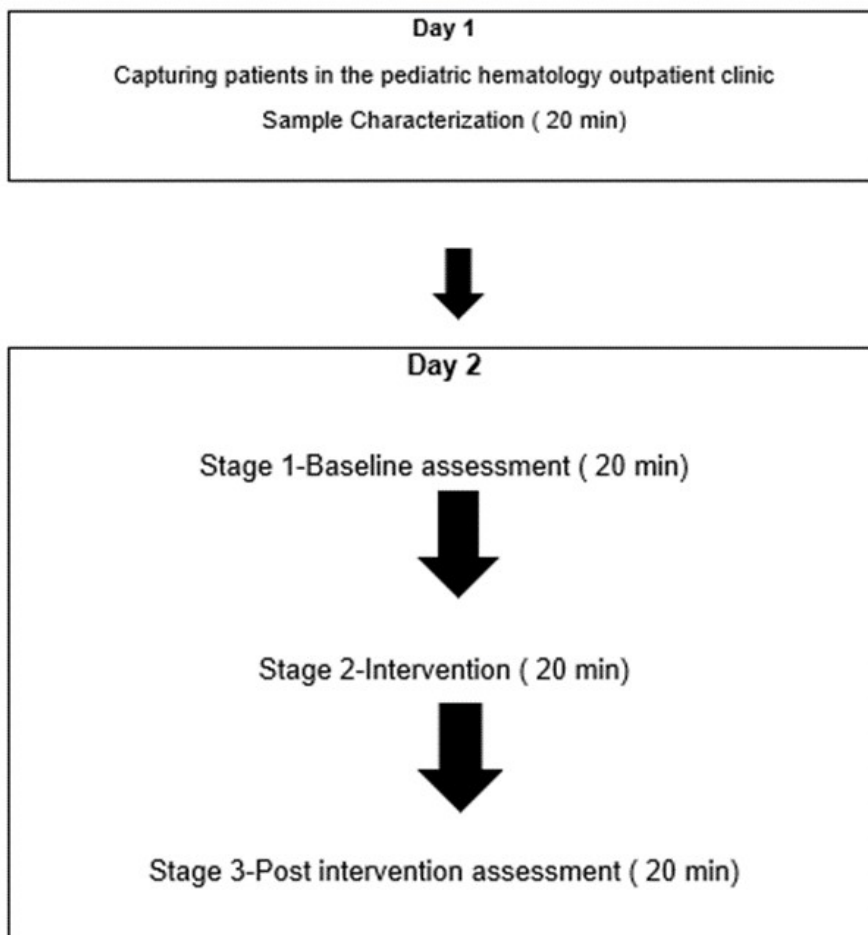
Click here to access/download

**Funding Documentation**

Termo\_Aditivo\_00048209578.pdf



## TIMELINE AND DURATION OF STUDY PROCEDURES



E  
N  
R  
O  
L  
L  
M  
E  
N  
T  
  
A  
L  
L  
O  
C  
A  
T  
I  
O  
N  
  
A  
S  
S  
E  
S  
S  
M  
E  
N  
T  
  
A  
N  
A  
L  
Y  
S  
E  
S

Elegibility screening and informed consent from

Exclude if inclusion critério are not met



Randomization of children with SCD

Children in the control group (n=24)

Wong Baker Scale +Active LA + EEG (n=24)



Wong Baker Scale +LA Sham (n=24)



Pain Intensity  
EEG power density



- 1.Independent Student t test or Mann-Whitney test
- 2. The paired Student's t test or Wilcoxon
- 3. Kruskal-wallis statistical test with p-value.

**PAIN ASSOCIATED BRAIN MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN CHILDREN,  
ADOLESCENTS AND YOUNG ADULTS WITH SICKLE CELL DISEASE**

**Carla Marques, BPhysio<sup>1</sup>; Larissa Lopes, BPh<sup>2</sup>;  
Rita Lucena, PhD<sup>3</sup>; Abrahão Fontes Baptista, BPhysio, PhD<sup>1,4,5</sup>**

1. Graduate Program in Medicine and Health, Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Brazil
2. State General Hospital, Salvador, Bahia, Brazil
3. Graduate Program in Medicine and Health, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil
4. Center for Mathematics, Computation and Cognition, Federal University of ABC, São Bernardo do Campo, Brazil
5. Laboratory of Medical Investigations 54 (LIM-54), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

**ABSTRACT**

Neuroimaging has been widely used to investigate the signature of the brain in patients with pain, but the results are heterogeneous. This systematic review aims to summarize the findings in the literature on morphofunctional brain changes in children with sickle cell disease (SCD). Analysis was performed to examine brain regions that showed significant changes in brain functions as assessed through structural or functional magnetic resonance imaging, or electroencephalography. The results highlight the potential of brain neuroimaging with functional magnetic resonance as a research tool for understanding pain in children with SCD and show increased connectivity in the precuneus and anterior cingulate cortex (ACC).

**INTRODUCTION**



Sickle cell disease (SCD) is a genetic hemoglobinopathy resulting from a mutation in the  $\beta$ -globin gene characterized by hemolytic anemia, vaso-occlusive pain and progressive organ failure. Vaso-occlusion is a multifactorial process that involves occlusion of small blood vessels by sickled red blood cells (RBCs), polymorphonuclear neutrophils, platelets, and activated endothelial cells. This occlusive process leads to hypoxia, and then ischemia of the upstream territories, which is associated with local inflammation, and pain [31]. Most children with sickle cell disease experience at least one pain crisis per year, and these have significant negative impacts such as poor quality of life, more frequent absences at school, depression and impaired relationships [28]. Pain is defined as an unpleasant sensory and emotional experience associated with, or similar to that associated with, actual or potential tissue damage [24]. In sickle cell disease it may be acute, chronic, but frequently acute pain episodes happen in the presence of chronic pain. A recent expert consensus suggests subdividing chronic pain in sickle cell disease into that associated with another identifiable cause, or that with no identified cause [12].

Acute pain episodes are abrupt at onset, unpredictable, and account for the greatest number of emergency room admissions, although these episodes are often managed at home [6]. Acute pain episodes increase in frequency with age, and a chronic pain syndrome evolves in 30% to 40% of adolescents and adults with SCD [6]. Chronic pain involves several processes of neuronal plasticity that have not yet been decoded in terms of involvement of specific circuits and cause-effect relationship [17]. An important characteristic of chronic pain is its sustained nature, which may involve brain regions related to cognitive and affective coping responses, in addition to sensory-discriminatory processes [18]. There is a consensus based on imaging studies that the origin of painful sensation is not restricted to a single area, but rather, pain results from the integration of brain areas, forming specific brain networks [17]. Human studies of brain networks, or brain connectivity, has initiated in the 90's with the development of structural and functional techniques such as tractography [2] and fMRI [4,30]

Results from previous studies suggest that pain in children is associated with structural gray matter changes, and that the magnitude of these structural changes is associated with pain duration [34]. Several brain regions must be involved, such as the posterior, and anterior cingulate cortices, medial prefrontal cortex, precuneus, lateral temporal lobe, hippocampus, parahippocampus, medial prefrontal cortex, and insula [18]. Also, specific networks may be involved, such as the emotion regulation network (ERN), and in the sensorimotor network

(SMN), and the default mode network [3]. However, categorizing patients only by having pain is very generic, as each pain condition and associated factor may strongly influence brain imaging. Previous studies have investigated brain changes associated with SCD pain in general [8,10,11,34,37].

## **METHODOLOGY**

### **METHOD LITERATURE RESEARCH PROCESS**

A systematic literature review was performed on PubMed, Latin American and Caribbean Literature on Health Sciences (LILACS) and Scientific Electronic databases. Library Online (SciELO) from March 2019 to December 2021. In addition, a manual search was performed by two reviewers in the references of the included studies. There was no date or language limitation. The following descriptors were used: Sickle cell disease, child, brain connectivity, functional connectivity, pain. This revision was previously registered in PROSPERO with the number 246716.

### **ELIGIBILITY CRITERIA AND SELECTION OF STUDIES**

Studies were included in the current systematic review if they met each of the following eligibility criteria: a) they included children (0-9 years), adolescents (10-19 years), young adults (20-29 years), with SCD following the WHO classification criteria; b) examined pain intensity/frequency/duration and/or functional impairment of pain; c) examined brain connectivity; d) examined brain thickness e) were quantitative studies; f) use magnetic resonance imaging, functional magnetic resonance imaging, electroencephalography, transcranial Doppler ultrasound and magnetic resonance angiography as evaluation measures. Non-empirical articles (eg, review articles, commentaries, practice guidelines, book chapters, case reports, dissertations, conference abstracts) were excluded.

## DATA COLLECTION AND ITEMS EXTRACTION

The search and analysis of articles was performed independently by two reviewers. After the titles and abstracts of the studies were evaluated, those that did not meet the eligibility criteria were excluded, and differences were resolved by a third reviewer. The studies that presented the predetermined criteria had their full text acquired for detailed analysis and data extraction. An electronic data extraction file was created to organize the relevant extracted data from each study. The extracted data pertain to the demographics of the participants, as well as variables evaluated and measures used.

## ASSESSMENT OF THE QUALITY OF STUDIES AND RISK OF BIAS

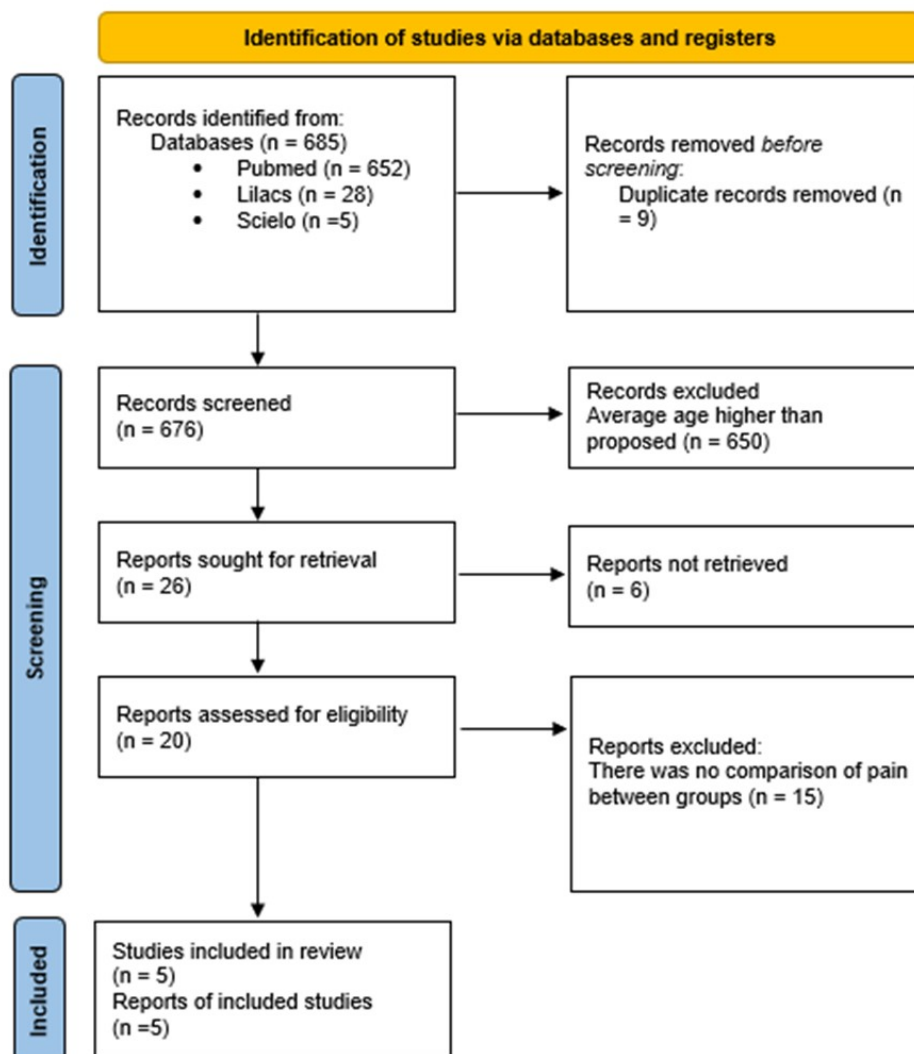
To assess the risk of bias, the selected articles were analyzed following the Newcastle-Ottawa Scale with an assessment of eight items, categorized into three groups: 1) selection of study groups; 2) comparability of groups and; 3) verification of the outcome of interest. The scale score ranges from four (minimum) to nine (maximum).

## LITERATURE SYNTHESIS

In the current review we identified brain regions that showed significant functional or structural changes in patients compared to control participants, or within patients between affected and unaffected sites. The reported brain regions were categorized into 14 regions of interest (ROIs) that are associated in previous studies with pain processing: anterior cingulate cortex, posterior cingulate cortex, ventromedial frontal cortex, insular cortex, primary motor cortex, right primary somatosensory cortex, subcortical standard mode network, supratemporal gyrus, parahippocampus, right precuneus, posterior precuneus, medial prefrontal region, right prefrontal region, posterior calcarine region. Categorization was performed separately for positive changes (eg, increased BOLD activity vs. control participants) and negative changes (eg, decreased BOLD activity in patients vs. control participants) /EEG (areas with increased connectivity versus areas with decreased connectivity).

## RESULTS

According to the search criteria, we initially identified 685 studies. Of these, 20 were selected for analysis after reading the abstract. We excluded others due to the presence of exclusion criteria (age group above that proposed by the study, there is no comparison between the pain intensity between the groups), leaving a total of five studies that we selected for discussion. Bibliographic information on the articles selected for review and the reasons for excluding the studies are available in Figure 1.



**Figure 1** - Flow chart of selected studies.

Eligible articles were published between 2009 and 2021 with the design of five cross-sectional studies (100%). The funding source was reported in 100% of the citations. With a sample size of no more than 40 children in the study, the total mean of children with FD = 25.4 and the standard deviation is SD = 12.95.

In total, 127 children, adolescents and young adults with SCD and 44 controls were evaluated. The sample size of participants with PD ranged from 12 to 40 individuals. Girls (64.5%) were evaluated more frequently than boys. These results are presented in Table 1. The experimental design of the studies shows that Functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) was the most used modality, corresponding to 80% of the studies. EEG, Transcranial Doppler Ultrasound (TCD), Structural Magnetic Resonance (MRI), and MR angiography were also used. All studies used full brain coverage. As covariates, age, gender, laboratory tests, amount of Hb ( hemoglobin ), correlation with fetal Hb, oxygen saturation (SatO<sub>2</sub>), number of transfusions, use of hydroxyurea, cognitive assessment, number of hospitalizations in the last 12 months were observed. , history of stroke, vasculopathy and painful events, economic status, quality of life and type of SCD. The authors proposed differences in brain regions related to pain processing (Table 3) between the control groups and the group of children, adolescents and young adults with sickle cell disease in relation to connectivity and cortical thickness detailed in the following meta-analysis (Table 2).

Table 1. Experimental design of the included studies and neuroimage findings

STUDY	SAMPLE	Age	Gender	MODALITY	STIMULUS/ LOCALIZATION	SIGN / technique	KEY FINDINGS
Colombatti et al., 2016	DF (40) Control (16))	DF (8.08 ± 2.83) Control (9.98 ± 2.8)	DF (21M, 19F) Control (5M, 11F)	fMRI at rest with DMN assessment	entire brain extension	BOLD/ ICA	↑ connectivity on precuneus
Darbari et al., 2015	Low pain (14) High pain (8)	Low pain (17 [12–20]) High pain (18.5 [13–22])	Low pain (5M, 9F) High pain (2M, 6F)	fMRI at rest	entire brain extension	BOLD/ ICA	Participants with more severe pain had ↑ connectivity of the dorsolateral/medial ACC (pro-nociceptive network) to Standard Mode Network structures (right precuneus and inferior parietal lobe) Participants with less severe/frequent pain had ↑ connectivity in the subgenual cingular cortex and somatosensory cortex (Antinociceptive Network)
Wang et al., 2021	DF (38)	11.45 ± 3.31	14M, 24F	MRI	entire brain extension	Voxel based morphometry	Perigenual anterior cingulate cortex (ACC) GMV was negatively associated with pain crisis frequency; The subgroup with crisis/crisis of pain in the last year had ↓GMV left supratemporal gyrus than the group without pain crisis; Negative correlation between pregenual ACC, subgenual ACC and frequency of pain crises.
Case 2019	DF (15), Controls (16)	less severe 21.4 (±5.7) more severe 21.7 (±6.3)	severe 8F, 7M more severe 7F, 9M	EEG e fMRI	entire brain extension	theoretic al analysis graphs	1. The most severe group had lower local efficiency and clustering coefficient compared to the control group and the less severe group. 2.EEG source images demonstrated that controls differed significantly from the beta I patient groups 3.More severely ill patients resulted from decreased crowding throughout the brain, including regions in the frontal cortex, temporal cortex, parietal cortex, occipital cortex, and subcortical regions. 4. SCD patients demonstrate altered network behavior in memory-related regions, such as the cerebellum, parahippocampus and prefrontal cortex, cerebellum, parahippocampus, prefrontal cortex
Zempsky 2017	12 DF , 12 controls	DF 22.8 (4.3) Controls 20.5 (4.6)	3 M 9 F	fMRI	entire brain extension	BOLD/ CA	Abnormalities in SCD patients in the brain's somatosensory network, salience network and default mode network during an unstructured resting state

Abbreviations: ICA - Independent Component Anal

Table 2 shows the results of the quality assessment and risk of bias for the studies included in this review. Study scores ranged from 8 to 9.

**Table 2.** Results of the quality assessment of the studies and risk of bias using the Newcastle Ottawa Scale

ARTICLE	SELECTION	COMPARISON BETWEEN GROUPS	RESULT	TOTAL
Collombati 2016	4	2	3	9
Darbari 2015	4	2	3	9
Wang 2021	4	1	3	8
Case 2019	4	1	3	8
Zempsy 2017	4	2	3	9

**Box 1 . Brain Connectivity versus cortical thickness**

<b>STUDIES ON THICKNESS</b>	FINDINGS
Wang 2021	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Thickness of the anterior cingulate cortex was negatively associated with frequent bouts of pain</li> <li>2. Decreased gray matter in the left supratemporal gyrus in the pain group</li> <li>3. Decreased gray matter in the parahippocampus</li> </ol>
Case 2019	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Decreased white and gray matter compared to the control group</li> </ol>
<b>CONNECTIVITY STUDIES</b>	FINDINGS
Collombatti , 2016	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Increased Default Mode Network connectivity in posterior precuneus in patients compared to controls</li> <li>2. Increased connectivity in the Default Mode Network in the medial prefrontal region, in patients with normal verbal IQ compared to controls</li> <li>3. Increased Default Mode Network connectivity, in the right prefrontal region, in normal MRI patients compared to controls</li> <li>4. Increased connectivity in the posterior calcarine sulcus in patients with 97% SaO<sub>2</sub> compared to patients with higher ox</li> </ol>
Darbari , 2016	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Increased central connectivity compared to the low pain group between the dorsal anterior cingulate cortex and the precuneus D; between the secondary somatosensory cortex and the left precuneus; between the inferior parietal lobe and the middle cingulate cortex; between the right posterior insular cortex and the right primary somatosensory cortex</li> <li>2. The standard mode network showed greater negative connectivity (anti-correlation) with the anterior insula in the low pain group compared to the high pain group</li> <li>3. The network emphasizes less negative connectivity with the perigenual anterior cingulate cortex in the low pain group compared to the high pain group</li> <li>4. The low pain group exhibited a negative correlation between HbF% and connectivity between the secondary somatosensory cortex and the left precuneus</li> <li>5. The low pain group had a positive correlation between the level of connectivity between the salience network and the perigenual anterior cingulate cortex and fetal hemoglobin levels</li> </ol>
Case 2019	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pain intensity related to lower clustering coefficient and local efficiency</li> <li>2. EEG source imaging demonstrated that controls differed significantly from patient groups in the beta1 band.</li> <li>3. Altered network behavior in memory-related regions such as the cerebellum, parahippocampus and prefrontal cortex</li> </ol>
Zempsyk 2017	Change in precuneus and CCA in addition to other regions of the standard mode, salience and somatosensory network



Table 3- Brain regions with connectivity alteration in children , adolescents and young adults with SCD

BRAIN REGION	Wang 2021	Case 2019	Colombatti 2016	Darbari 2015	Zempsky 2017
<b>Network Standard Mode</b>					
MEDIAL CINGULAR CORTEX					↓
ANTERIOR CINGULAR CORTEX	↓			↑	↑
PRECUNEUS RIGHT			↑	↑	↓
PRECUNEUS LEFT			↑	↑	↓↑
LEFT ANGULAR TURN					↑
UPPER LEFT FRONT SWING					↓↑
UPPER RIGHT FRONT TURN					↑
LOWER LEFT FRONT TURN					↓
LEFT MEDIAL FRONT TURN					↑
LOWER FRONT TURN					↓
RIGHT MEDIAL TEMPORAL TURN					↑
RIGHT MEDIAL TEMPORAL TURN					↑
UPPER RIGHT MEDIAL TURN					↑
CALCARINE TURN			↑		↑
PARAHIPOCAMPO		↓			
RIGHT INSULA					↓
<b>Saliência Network</b>				↑	
ÍNSULA ANTERIOR				↑	
DORSAL ANTERIOR CINGULATED CORTEX				↑	
RIGHT MEDIAL FRONT TURN					↓↑

LOWER LEFT FRONT TURN					↑
RIGHT SUPRAMARGINAL TURN					↓
UPPER LEFT MEDIAL GROUP					↑
LEFT INFERIOR PARIETAL LOBE				↑	↓
<b>Somatosensorial Network</b>					
LEFT PRE-CENTRAL TURN					↓
RIGHT PRE-CENTRAL TURN					↓
LEFT MEDIAL FRONT TURN					↑
LEFT LOWER/MEDIAL FRONT TURN					↑
RIGHT SUPRAMARGINAL TURN					↑
ROLANDIC OPERCULUM					↓
<b>DIPFC *</b>	↑	↓	↑		
<b>Cerebelum</b>		↓			
<b>white substance</b>		↓			
<b>gray matter</b>	↓	↓			

As a secondary finding, we observed that the older the child, the higher the reported pain intensity of the adolescent with SCD. Usually in adolescence there is an increase in the frequency of painful crises, longer hospitalization time and the onset of chronic pain.

## DISCUSSION

This study sought to identify patterns of abnormal structure and/or functional activity in the brains of children , adolescents and young adults with SCD through a systematic review of the literature. The results of cross-sectional studies show a decrease in cortical thickness and

an increase in functional connectivity, mainly concentrated in the precuneus and anterior cingulate cortex, regions that constitute the Default Mode Network and/or the Pronociceptive Network. These changes correlate with the frequency of pain and hospitalizations and connectivity increased in structures of the Antinociceptive Network is associated with a decrease in the frequency of pain crises and their consequences.

From the point of view of brain networks, the precuneus and the anterior cingulate cortex are included in the DMN. The precuneus is a region frequently associated with pain processing, presenting a decrease in its thickness in individuals with SCD and frequent pain crises [16,25,34]. This region is involved in sensorimotor, cognitive and visual coding [9] and is related to individual differences in pain sensitivity [15]. As the connectivity of the precuneus is able to reflect the brain maturation that occurs through the from childhood to adulthood [36] and the studies included in this review compared participants with and without SCD and pain, it is possible to suggest that the presence of pain may enhance connectivity in this region through neurodevelopment. This may also characterize a specific signature for this type of clinical condition and a possible target for interventions. Changes in the thickness, activity and connectivity of the anterior cingulate cortex are present in both acute and chronic pain in general [24], being eminently involved in affective processing and coding of pain intensity[14]. Synaptic changes in this region seem to be crucial for the transition from acute to chronic pain [5, 39]. Its connection with pain control areas such as the periaqueductal gray matter suggests that, in addition to being able to contribute to negative modulation, it may also contribute to endogenous pain control [25]. Being an area in the executive control of attention, emotions and social cognition [1,29] its maturation is especially important in the first or second decade of life [7,26]. Abnormal development of this area has already been associated with neurodevelopmental disorders such as attention deficit hyperactivity disorder [38], and autism [23], which highlights the possibility that the presence of pain from childhood in individuals with SCD may have negative impacts. far beyond suffering, but involving fundamental cognitive and emotional functions for a quality life.

The findings of this study may suggest differences between the brains of adults and children/adolescents with SCD and chronic pain. In adult individuals with chronic pain, more brain networks are compromised, such as the salience network, more areas of the default mode network, and the sensorimotor network. Adults with SCD who experience high levels of pain and hospitalizations showed increased resting-state functional connectivity between

the salience (SLN), default mode (DMN) and sensorimotor network (SMN) structures when compared with subjects with low levels of pain and hospitalizations [20]. Zempky et al [37] demonstrated hyperconnectivity of various regions of the frontal lobe, more specifically in the precuneus and posterior cingulate cortex and Case et al. [8] also demonstrated that the Standard Mode Network increased connectivity with sensory regions in individuals with SCD. In the study carried out by Veldhuijzen [33], brain responses to painful stimuli and cognitive tasks showed no variation during the menstrual cycle with the precuneus, the PCC and the inferior parietal cortex. Comparing the findings of brain changes between adults and children/adolescents with SCD and pain suggest that there is less brain impairment in children compared to adults, which needs to be demonstrated in longitudinal studies.

Finally, this study shows that functional connectivity has the potential to assist in the diagnostic classification of different pain conditions, which can predict individual responses to specific therapeutic interventions and serve as a gateway to personalized medicine [32].

The small amount of studies, and their cross-sectional designs limit to affirm that all brain changes found in our study are a consequence of pain in this specific population. Also, it is very difficult to group children, adolescents, young adults and young adults with SCD with a history of pain in the same study. Another limitation is related to the neuroimaging methods used. The majority of the included studies used structural and functional magnetic resonance imaging as a method of investigation and only one study, with a mean age corresponding to young adults used EEG. Due to the heterogeneity of the studies, it was not possible to conduct a quantitative synthesis of the results of the included studies through a meta-analysis. It is suggested that future studies use strategies such as quantitative electroencephalography and near-infrared spectroscopy to assess brain activity in children, as well as longitudinally assess changes in the presence of pain in individuals with SCD.

## **CONCLUSION**

Children, adolescents and young adults with SCD present decreased thickness and connectivity in the precuneus and anterior cingulate cortex.

