



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JACKSON S. GULLO**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE PENTRAXINA 3 E A  
MORTALIDADE DE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO CRÂNIO-  
ENCEFÁLICO GRAVE**

**FLORIANÓPOLIS  
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

G973a Gullo, Jackson da Silva

Associação entre os níveis séricos de pentraxina 3 e a mortalidade de pacientes vítimas de traumatismo crânio-encefálico grave [dissertação] / Jackson da Silva Gullo ; orientador, Roger Walz. - Florianópolis, SC, 2010.

42 p.: grafs., figuras

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências médicas. 2. Traumatismo crânio-encefálico. 3. PTX3. 4. Pentraxina 3. 5. Prognóstico. 6. Sistema humoral imune inato. I. Walz, Roger. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

CDU 61

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE PENTATREXINA 3 E A  
MORTALIDADE DE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO CRÂNIO-  
ENCEFÁLICO GRAVE**

Dissertação de mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas – PGCM, do Centro de Ciências da Saúde - CCS, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

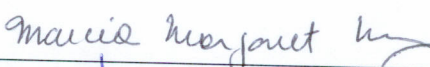
**FLORIANÓPOLIS  
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

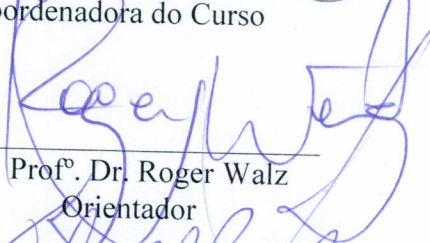
  
\_\_\_\_\_  
JACKSON DA SILVA GULLO

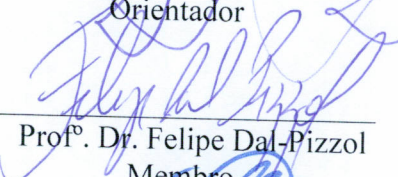
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
**MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

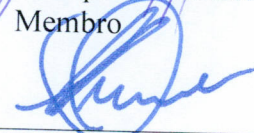
COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM **INVESTIGAÇÃO CLÍNICA** E APROVADA EM SUA  
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Roger Walz  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Felipe Dal-Pizzol  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup> Dr. João Luciano Quevedo  
Membro

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2010.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus.

Ao professor Roger Walz por todo o incentivo e por acreditar no meu trabalho. Que sempre conduziu de forma exemplar o trabalho do NUPNEC – UFSC.

Aos colegas e amigos do NUPNEC – UFSC, especialmente, Flávia, Maria Emília, Douglas, Alexandre Hohl, Alexandre Paim, Libóro, Cláudia, Melina e aos demais membros do grupo.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional desde minha formação inicial.

Aos amigos que sempre me incentivaram e vibraram com minhas vitórias.

Aos funcionários do Hospital Governador Celso Ramos, em especial ao Laboratório Santa Luzia.

## RESUMO

**Introdução:** O trauma cranioencefálico (TCE), é a umas das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo. Pentraxina 3 (PTX3) é um componente do sistema humoral de resposta imune inata que tem sido estudada como marcador para inflamação, infecções ou patologias cardiovasculares.

**Objetivos:** Investigar a associação entre os níveis séricos de PTX3 e a mortalidade de pacientes com TCE grave.

**Métodos:** A associação independente entre os níveis séricos de PTX3 após o TCE grave (Escala de Coma de Glasgow, ECG  $\leq 8$ ) e a mortalidade no momento da alta foi analisada em um estudo prospectivo de 83 pacientes consecutivos, por uma análise de regressão logística múltipla.

**Resultados:** A média de idade dos pacientes foi de 35 anos e 85 por cento são homens. Os níveis séricos de PTX3 são determinados em 18.0 (DP  $\pm 17.0$ ) horas após o trauma. Pacientes que morreram apresentaram uma média no nível sérico de PTX3 de 9,95  $\mu\text{gm} / \text{ml}$  (DP  $\pm 6,42$ ) em comparação com 5,46  $\mu\text{gm} / \text{ml}$  (DP  $\pm 4,87$ ) no Grupo de sobreviventes ( $p = 0,007$ ). Após a análise por regressão logística múltipla, níveis séricos de PTX3 maior que 10  $\mu\text{gm}/\text{ml}$  foi 3 vezes mais associado com à morte do que os níveis mais baixos (OR ajustado 3.38, IC 95% 1.10 – 10.45,  $p = 0.03$ ). A idade avançada, anormalidades pupilares e menor pontuação na ECG também foram associadas independentemente à mortalidade.

**Conclusão:** Níveis séricos de PTX3 após o TCE grave estão associados à maior mortalidade no momento da alta. Nossa descoberta sugere que PTX3 pode ser um marcador útil de TCE grave e seu prognóstico.

**Palavras-Chave:** Traumatismo crânio-encefálico; Pentraxina 3; PTX3; Sistema humoral imune inato; Prognóstico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Traumatic brain injury (TBI) is a worldwide cause of morbidity and mortality. Pentraxin 3 (PTX3) is a humoral innate immune system component which has been studied as marker for inflammatory, infections or cardiovascular pathology.

**Objectives:** To investigate the association between the serum levels of PTX3 and the mortality of patients with severe TBI.

**Methods:** The independent association between serum PTX3 levels after the severe TBI (Coma Glasgow Scale, GCS  $\leq$  8) and the mortality at the time of discharge was analyzed in a prospective study of 83 consecutive patients by a multiple logistic regression analysis.

**Results:** The mean age of patients was 35 years and 85 percent were male. The serum PTX3 levels were determined at 18.0 (SD  $\pm$  17.0) hours after the TBI. Patients who died showed a mean serum PTX3 level of 9.95  $\mu$ g/ml (SD  $\pm$  6.42) in comparison to 5.46  $\mu$ g/ml (SD  $\pm$  4.87) in the survivors group ( $p = 0.007$ ). After the multiple logistic regression analysis, serum levels of PTX3 higher than 10  $\mu$ g/ml was 3 times more associated with death than lower levels (Adjusted OR 3.38, CI 95% 1.10 – 10.45,  $p = 0.03$ ). Older age, pupillary abnormalities and lower scores in the GCS were also independently associated with mortality.

**Conclusions:** Serum PTX3 levels after the severe TBI are independently associated with higher mortality at the time of discharge. Our findings suggest that PTX3 may be a useful marker of TBI and its prognosis.

**Key words:** Traumatic brain injury; Pentraxin 3; PTX3; Humoral innate immune system; prognosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Classificação de Marshall.....	<b>11</b>
<b>Figura 2</b> - Escala de Coma de Glasgow .....	<b>12</b>
<b>Figura 3</b> - Mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TCE. ....	<b>14</b>
<b>Figura 4</b> - Papel da pentraxina: ativação complementar e regulação.....	<b>17</b>



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO .....	10
1.2 PENTRAXINA 3 .....	14
1.2.1 PTX 3 e seus ligantes.....	15
1.2.2 PTX3 – Produção e Regulação.....	16
<b>2 OBJETIVO</b> .....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 PACIENTES .....	19
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	19
3.3 VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	20
3.4 CONTROLES .....	20
3.5 ENSAIO: DOSAGEM DA PTX3.....	20
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	23
<b>4 ARTIGO ORIGINAL</b> .....	24
<b>CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38
<b>APÊNDICES</b> .....	41
<b>APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO ALUNO DURANTE O PERÍODO DE</b> .....	42

## INTRODUÇÃO

### 1.1 TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO




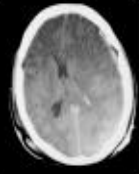
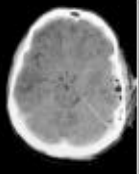
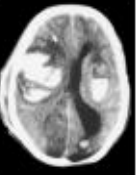
Traumatismos, em geral, são bastante freqüentes e constituem um problema social e de saúde pública de enorme proporção.<sup>1-3</sup> São considerados a principal causa de morte em pessoas com idade inferior a 45 anos, tanto no Brasil como nos EUA e em outros países desenvolvidos.<sup>1, 3-6</sup> Dentre os traumatismos, o traumatismo crânio encefálico (TCE) é a maior causa de morbidade, mortalidade e incapacidade neurológica nesta faixa etária.<sup>1, 3, 5, 6</sup>

Em estudos populacionais que incluem todas as idades têm sido observado uma incidência trimodal de maior ocorrência de TCE, que são em crianças menores de um ano, final da adolescência/ início da idade adulta e em idosos (>64 anos).<sup>3</sup> Quanto ao sexo, a maior incidência de TCE é observada em homens, principalmente em adolescentes e adultos jovens.<sup>3</sup> Estudo prospectivo de 596 casos de TCE grave admitidos na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital de referência em neurotrauma em Florianópolis - Santa Catarina constatou que 77,8% dos casos envolveram acidentes de trânsito (acidentes automobísticos, moto e atropelamento).<sup>7</sup>

A incidência de TCE em países desenvolvidos é estimada em 1,6 milhões de pessoas a cada ano, aproximadamente 200 por 100.000 habitantes, das quais 270.000 recebem hospitalização.<sup>3-5</sup> Dessas, 52.000 morrem e 80.000 permanecem com graves seqüelas neurológicas, acarretando ao governo um custo direto e indireto estimado de quatro bilhões de dólares ao ano.<sup>3-5</sup> Esses dados tipicamente incluem somente vítimas de TCE que são admitidos em hospitais, o que certamente subestima sua incidência total.<sup>3</sup> As principais causas de TCE são acidentes automobilísticos, violência e quedas.<sup>3-5</sup> Em Santa Catarina, dados do SINETRAN/DETRAN de 2003, contabilizaram 1679 mortes por acidentes de trânsito, principal causa de TCE, sendo que 81 % destas ocorreram em pacientes com idade entre 10 e 50 anos.

A classificação de lesões cerebrais utilizada é a proposta pelo *Traumatic Coma Data Bank* (TCDB) que diferencia o TCE em quatro tipos de lesões difusas e







dois tipos de lesões focais de acordo com achados neuroradiológicos da TC (escala de Marshall, Figura 1). Outra forma de classificar as lesões do TCE é em lesões primárias e secundárias . A primeira ocorre no momento do trauma e decorre da aceleração/desaceleração e de movimentos do encéfalo no interior da calota craniana. A segunda são manifestações clínicas mais tardias decorrentes de eventos sistêmicos ou da resposta tissular ao dano primário e são potencialmente evitáveis. O processo de isquemia cerebral é uma lesão secundária que desencadeia uma cascata de fatores bioquímicos de grande importância na fisiopatologia do TCE.<sup>8</sup>

Tipo de lesão	L. Difusa tipo I	L. Difusa tipo II	L. Difusa tipo III	L. Difusa tipo IV	Massa Evacuável	Massa não Evacuável
Características radiológicas	TC normal	Pequenas lesões (Linha média centrada e cisternas visíveis)	Swelling bilateral (Ausência de cisternas de base)	Swelling unilateral (Linha média desviada >5mm)	Qualquer lesão evacuável	Lesão >25ml não evacuável
TC exemplo com cada tipo de lesão						

FONTE: Marshall LF et al. A new classification of head injury based on computerized tomography. *J.Neurosurg.* 1991; 75: 14-20.

**Figura 1 - Classificação de Marshall.**

A classificação do nível de consciência mais aceita na prática clínica é a Escala de Coma de Glasgow (ECG).<sup>3</sup> A ECG avalia três parâmetros independentes: a resposta verbal, a resposta motora e a abertura ocular. A ECG permite classificar a gravidade do TCE numa escala de pontuação que varia de 3 a 15 pontos.<sup>3</sup> Considera-se TCE leve pacientes com pontuação de 13 a 15, moderado de 9 a 12 e grave de 3 a 8.<sup>3</sup> Apesar de ser instrumento valioso na avaliação do estado neurológico, pode haver subestimação da pontuação em situações onde há impedimento na avaliação de um ou mais indicadores.<sup>10</sup>

<b>Escala de Coma de Glasgow</b>		<b><u>Resposta Motora</u></b>	
<b><u>Resposta Verbal</u></b>		Obedece ordens	 6
Orientada	5	Localiza a dor	 5
Confusa	4	Retirada a dor	 4
Inapropriada	3	Flexão anormal	 3
Incompreensível	2	Extensão	 2
Sem resposta	1	Sem resposta	 1
<b><u>Abertura Ocular</u></b>			
Espontânea	4		
Aos comandos	3		
À dor	2		
Sem abertura	1		

FONTE: Jennett B et al. Disability after severe head injury: observations on the use of the Glasgow Coma Scale. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatr.* 1981; 44:285-293.

**Figura 2 - Escala de Coma de Glasgow**

A inflamação consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas.<sup>12</sup> As reações inflamatórias são desencadeadas por vários estímulos, dentre eles o trauma.<sup>12</sup> As citocinas, mediadores químicos da inflamação, são proteínas de baixo peso molecular, secretadas no espaço extracelular ou expressas na superfície das células.<sup>12,13</sup> São produzidas por vários tipos de células, principalmente linfócitos e macrófagos ativados.<sup>12</sup> Na presença de lesões no SNC, diversas citocinas podem ser expressas por células residentes do SNC, como as micróglia.<sup>14</sup> Atuam como moléculas sinalizadoras, modulando a função de outros tipos celulares.<sup>12,14</sup>

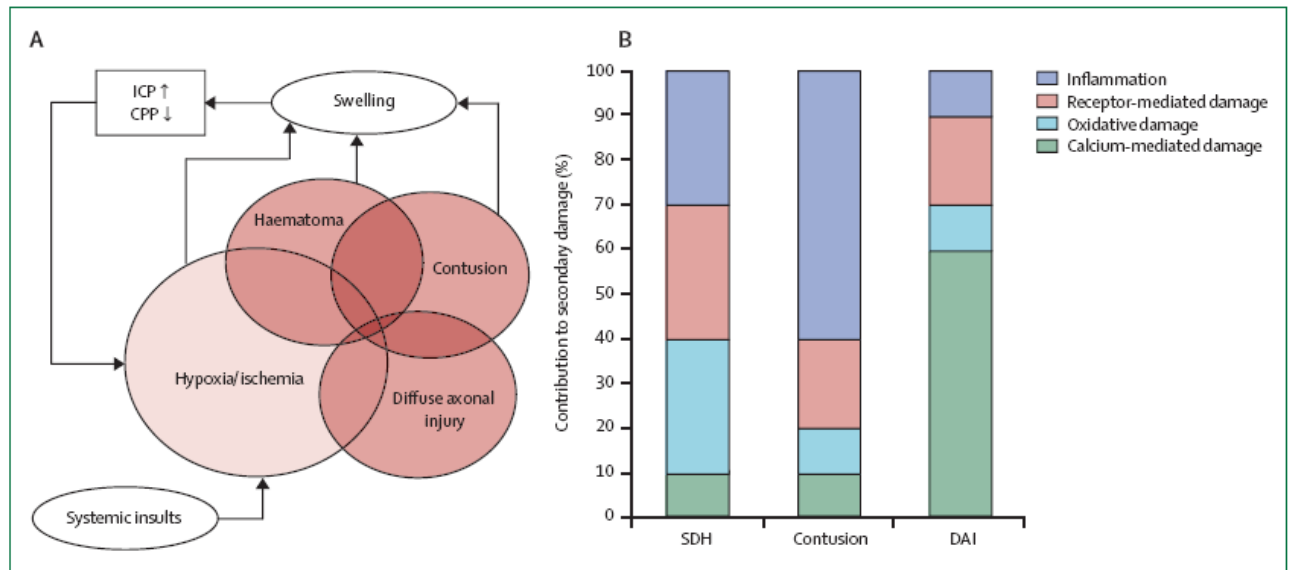
A composição e a regulação da resposta inflamatória dependem da migração controlada de populações leucocitárias. As células T CD4<sup>+</sup>, também denominadas T-helper (Th), podem ser subdivididas em dois subgrupos dependendo do padrão de citocinas produzidas: Th1 e Th2. Células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias,

dentre as quais  $\text{INF-}\gamma$ , IL-2,  $\text{TNF-}\beta$  e  $\text{TNF-}\alpha$ . As células Th2 produzem citocinas estimuladoras de células B e anti-inflamatórias, dentre as quais IL-4, IL-5, IL-13.<sup>15,16</sup>

No cérebro, as citocinas normalmente são encontradas em baixas quantidades e o seu aumento está associado com desordens no SNC que envolvem quebra da barreira hemato-encefálica. A super expressão de citocinas no cérebro é um dos fatores que contribui na patogênese da neurotoxicidade e em desordens degenerativas. O aumento no processo inflamatório sistêmico, incluindo o extravasamento de leucócitos ativados e citocinas, pode contribuir para o aumento da ocorrência de danos no SNC, já que a circulação periférica de citocinas e outros fatores neurotóxicos pode aumentar o dano em outros órgãos além do cérebro.<sup>17,18,19</sup>

Após o TCE, ocorre rompimento da barreira hemato-encefálica, resultando na ativação das células microgliais intrínsecas. recrutamento do sistema fagocitário mononuclear (monócito) para o sítio da lesão e reatividade astrogliar.<sup>20</sup> A resposta inflamatória em indivíduos que sofreram TCE é rápida e disseminada e o mecanismo pelo qual as citocinas induzem neurotoxicidade ou neuroproteção necessita ser determinado. O grau de envolvimento da ativação microglial, astrocitária e da resposta inflamatória após TCE promove efeitos neuroprotetores bem como neurotóxicos e o equilíbrio entre a resposta Th1/Th2 é o principal mecanismo de manutenção das funções cerebrais.<sup>21,22,23</sup> Possivelmente o tempo de indução dessa resposta (pró ou anti-inflamatória) está envolvido com a progressão dos danos ocasionados pelo trauma.<sup>22,24,25</sup>

A identificação desses marcadores bioquímicos em associação com variáveis clínicas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas são um importante desafio científico na identificação de marcadores prognósticos e de possíveis alvos terapêuticos no TCE.<sup>26</sup>



Fonte: Maas A I R, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 2008; 7: 728–41.

**Figura 3 – Mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TCE.**

## 1.2 PENTRAXINA 3

A pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína de 45 kDa que se organiza em multímeros de alto peso molecular através de pontes dissulfeto entre suas cadeias e pertencente ao grupo das pentraxinas de cadeia longa.<sup>28</sup>

O gene PTX3 foi identificado através da hibridização de uma biblioteca de cDNA construída a partir de fibroblastos humanos induzidos por TNF.<sup>29</sup> Sua identificação foi feita em células endoteliais humanas provenientes de cordão umbilical tratadas com IL1 $\beta$ .<sup>30</sup> Diferentemente das pentraxinas de cadeia curta, o gene da PTX3 manteve sua sequência altamente conservada durante a evolução e está localizado em uma região sintênica no cromossomo 3 (q24-28) entre os mamíferos, tanto em humanos como murinos. Além disso, as proteínas codificadas por eles possuem alto grau de conservação: ambas possuem 381 aminoácidos (aa), tendo 82% de aa idênticos e 92% de aa conservados. Desta forma, os estudos com PTX3 têm sido voltados para uma abordagem estrutural e ensaios com camundongos geneticamente modificados de forma que se podem identificar

inúmeras propriedades desta pentraxina no caminho entre resposta imune e inflamatória.<sup>31,32</sup>

### 1.2.1 PTX 3 e seus ligantes

As múltiplas funções desempenhadas pela PTX3 têm origem na sua propriedade de interagir com diversos ligantes. Assim como as pentraxinas de cadeia curta, o primeiro ligante bem caracterizado da PTX3 foi C1q.<sup>33</sup> Possivelmente, de acordo com seu arranjo multimérico, PTX3 possui a capacidade de interagir com C1q tanto na fase aguda agregada, promovendo precipitação de C3 e C4 com a consequente ativação clássica do sistema complemento, quanto em sua fase solúvel, quando, de forma oposta, promove a inibição dos sítios de ativação de C1q, diminuindo a ativação do complemento. Outros estudos demonstraram que o grau de glicosilação da molécula PTX3 modula a interação da pentraxina com C1q. Uma vez deglicosilada, a molécula aumenta a sua afinidade por C1q promovendo maior ativação do sistema complemento com consequente consumo de C3 e C4.<sup>34</sup>

Células em apoptose também são ligantes de PTX3. Semelhantemente ao que ocorre com as pentraxinas de cadeia curta (PCR e SAP), a ligação com PTX3 também impede a fagocitose de células apoptóticas pelas células dendríticas.<sup>35</sup> As pentraxinas possuem um sítio comum de ligação, podendo fazer parte do complexo de histonas e ribonucleoproteínas que se rearranjam na membrana plasmática em fases tardias do processo de apoptose.<sup>36</sup>

A interação desta propriedade com o fato de PTX3 interferir na maturação de células dendríticas e sua produção de citocinas, confere a PTX3 a capacidade de amplificar o potencial de resposta a estímulos inflamatórios, além de inibir o reconhecimento de epítomos antigênicos próprios e sua apresentação ocasional a células CD28+ com potencial dano promovido a partir de respostas auto-imunes.

Entre os principais ligantes para PTX3 encontramos o FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos tipo 2).<sup>37</sup> A interação de PTX3 e FGF2 gera a inibição das funções do fator de crescimento com consequente ação anti-angiogênica e anti-proliferativa.

### 1.2.2 PTX3 – Produção e Regulação

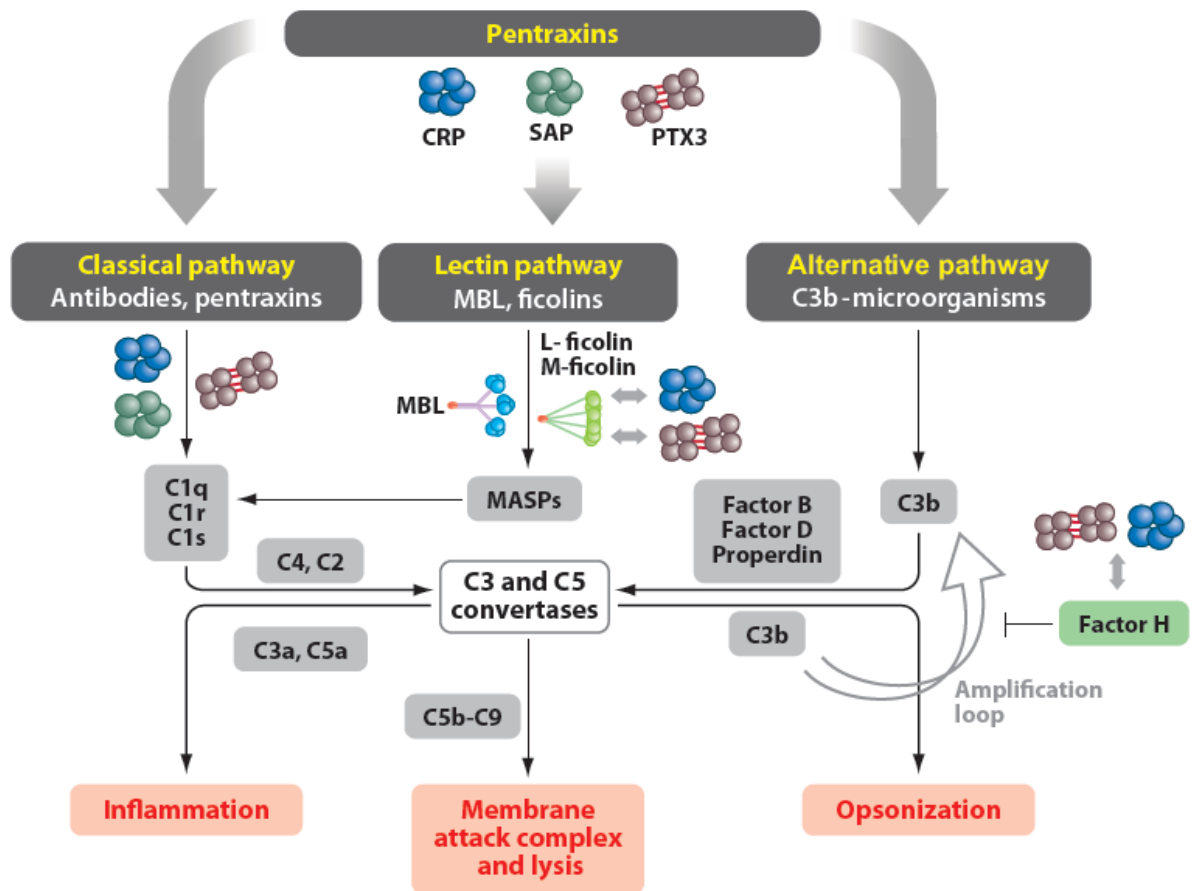
A PTX3 pode ser produzida por diversos tipos celulares, diferentemente das pentraxinas de cadeia curta que são originadas no tecido hepático sob estímulo de IL-6 (interleucina 6). A PTX3 é sintetizada principalmente por macrófagos e células endoteliais,<sup>37</sup> células dendríticas de origem mielóide, fibroblastos, adipócitos, células sinoviais e condrócitos além de células epiteliais o rim e dos alvéolos pulmonares.<sup>33</sup>

A regulação da expressão do gene de PTX3 parece estar envolvida com o estímulo de mediadores de substâncias exógenas. Estudos *in vitro* demonstraram que a exposição a mediadores inflamatórios, tais como TNF e IL 1, resíduos microbianos, como LPS, proteína A da membrana externa (OmpA) de enterobactérias e outros agonistas para receptores do tipo toll like (TLR) induzem a produção de PTX3. A Pentraxina 3 assume papel de mediador inflamatório em modelos de resposta inflamatória inata *in vivo*, sobretudo relacionada ao recrutamento de TLR.<sup>38-40</sup>

Além da resposta regulada por sua expressão gênica, parece existir um mecanismo de resposta rápida a pentraxina 3 armazenado em grânulos específicos de neutrófilos. O PTX3 é então liberado, mediante o reconhecimento de microorganismos e sinais inflamatórios, de maneira que os polimorfonucleares servem de reservatório para esta molécula com importante função na opsonização e resposta imune inata, o que permite uma diminuição de tempo de resposta.<sup>39,41</sup>

O interferon  $\gamma$  (IFN) e a IL10 exercem influências antagônicas sobre a expressão de PTX3. O IFN inibe a produção de PTX3 induzida por LPS enquanto IL10 promove a expressão de pentraxina 3 em monócitos e células dendríticas, além de ter efeito sinérgico na estimulação de PTX3 por IL1 e LPS, além de outros agonistas TLR.<sup>41-43</sup> Deste modo, é importante que analisemos um papel desta pentraxina na fase resolutiva do processo inflamatório. Além de ter seu conhecido papel na organização da matriz extracelular, a expressão de PTX3 em fibroblastos e células dendríticas após o estímulo por IL10 aponta para uma deposição na matriz, reparo e remodelamento.<sup>44</sup>





Fonte: Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. *Annu. Rev. Immunol.* 2010. 28:157–83.

Figura 4 – Papel da pentraxina: ativação complementar e regulação.

## **2 OBJETIVO**

Determinar os níveis séricos da proteína Pentraxina 3 (PTX 3) e sua associação com a mortalidade de pacientes vítimas de TCE grave até o momento da alta hospitalar.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PACIENTES

Foram incluídos no estudo 88 pacientes consecutivos admitidos com TCE grave (Escala de coma de Glasgow  $\leq 8$  na admissão) no Hospital Governador Celso Ramos (HGCR) no período de abril de 2006 a outubro de 2008. O HGCR é o hospital público estadual de referência em neurotrauma na Grande Florianópolis, Santa Catarina – Brasil. Os pacientes foram atendidos basicamente pela mesma equipe de enfermagem, intensivistas e neurocirurgiões ao longo do período.

Foram excluídas do estudo as vítimas de projéteis de armas de fogo, pacientes com exame neurológico compatível com morte encefálica nas primeiras 24 horas de admissão na UTI e com falta de consentimento informado do responsável pelo paciente.

#### 3.2 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após concordância do responsável pelo paciente em participar do estudo, foram coletadas amostras de sangue o mais breve possível após a chegada do paciente ao hospital (primeira coleta) e duas coletas subseqüentes (24h e 72h após a primeira coleta).

De cada paciente, coletaram-se três amostras de sangue de 5 mL cada, através de s-monovette com EDTA e sem EDTA. As amostras ficaram em repouso por 5 a 10 minutos. Após repouso foram centrifugadas por 15 minutos em centrífuga – modelo Celm Combat, ano 2000, raio de 165 mm e velocidade de 342 rpm. O material centrifugado foi separado em tubos tipo eppendorfs (três contendo soro e três contendo plasma). Os eppendorfs foram armazenados em freezer de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas no HGCR e posteriormente em freezer de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  no laboratório de Doenças de Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC. O

transporte foi realizado em isopor com gelo seco e não houve descongelamento de nenhuma amostra durante o transporte.

### 3.3 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Foram coletadas as variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas (Apêndice A) conforme o protocolo do Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica da UFSC (NUPNEC), incluindo: idade, sexo, insuficiência renal, classificação tomográfica de Marshall, presença de hemorragia sub-aracnóide na TC, ECG na admissão e resposta pupilar na admissão.

Os pacientes também foram classificados como tendo ou não trauma associado, caso apresentassem trauma abdominal, torácico ou em membros que exigisse abordagem cirúrgica.

Também foram analisadas variáveis no momento das coletas de sangue utilizadas para mensurar PTX3, incluindo: pressão arterial (sistólica e diastólica), frequência cardíaca, frequência respiratória, gasometria arterial, glicemia, sódio, potássio, uréia, creatinina, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais e plaquetas.

### 3.4 CONTROLES

Foram utilizadas 10 amostras de indivíduos adultos, saudáveis e pareados para sexo e idade aos casos em estudo. O sangue foi coletado, processado e armazenado mantendo-se condições semelhantes a dos pacientes em estudo.

### 3.5 ENSAIO: DOSAGEM DA PTX3

A detecção da PTX3 em nossas amostras foi realizada pelo método de

ELISA, com a utilização de placas (NUNC, MaxiSorp, Roskilde, Denmark) contendo 96 wells.

A sensibilização de cada well foi feita, individualmente, com 100 µl de anticorpo monoclonal (mAb) de rato anti-PTX3 MNB4 (líquido de ascite diluído 1:700 em tampão carbonato 15 mM, pH 9.6). As placas foram incubadas “overnight” a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas, por três vezes, com PBS (phosphate buffered saline) de Dulbecco, contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem), em um lavador automático de placas. A seguir, para que possibilitássemos o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos, utilizamos 300 µl de leite em pó desnatado a 5% para cada well. Após 2 horas de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por três vezes com o tampão de lavagem.

As amostras de plasma, assim como os padrões de PTX3 recombinante purificada (75 pg/ml a 2,4 ng/ml) foram diluídas em meio RPMI 1640 (Seromed, Berlin, Germany), acrescido de soro albumina bovina (BSA, Sigma Chemicals, St. Louis, CO) a 2% e adicionadas na placa em alíquotas de 50 µl por well, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por duas horas. Após a incubação, as placas foram lavadas por três vezes com o tampão de lavagem.

A seguir, em cada “pocinho” (well), foi adicionado 100 µl de IgG de coelho conjugado à biotina e dirigida contra a PTX3, diluída a 1:20 000 em tampão de lavagem. Após incubação a 37°C por uma hora, as placas foram novamente lavadas por três vezes com o tampão de lavagem. A seguir, em cada well, foram adicionados 100 µl de estreptavidina-peroxidase conjugadas ao dextran (Amdex, Copenhagen, Denmark), na diluição de 1: 4000, e as placas incubadas por uma hora na temperatura ambiente.

Após a incubação, as placas foram lavadas por cinco vezes e, então, adicionados 100 µl de substrato cromógeno ABTS (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) em cada well. Após 15 minutos, as amostras nas placas foram lidas em 405 nm, em um leitor automático de ELISA, e os resultados calculados a partir das leituras em duplicata das amostras e das concentrações conhecidas de PTX3, para determinação da curva padrão.

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram <10%. O ensaio de detecção da PTX3 na fase líquida do sangue tem uma sensibilidade de 150 pg/ml, e não faz reações cruzadas com a proteína C reativa (CRP) ou com a proteína amilóide A do soro.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise univariada foi feita para determinar associações entre variáveis clínicas, demográficas, radiológicas, neurocirúrgicas, níveis plasmáticos e a mortalidade pós-trauma.

Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste T de Student e também categorizadas. Variáveis categóricas foram analisadas por regressão logística binária. Como os níveis séricos de PTX3 abaixo de 150 pg/ml são indetectáveis os valores foram expressos em medias (intervalo interquartil, IQ, 25 – 75), e as diferenças entre esses níveis nos sobreviventes e não sobreviventes foi analisada por um teste não paramétrico (Mann-Whitney U test).

As comparações entre os níveis de PTX3 medidos no primeiro, segundo e terceiro dia após o trauma foram analisadas pelo teste Wilcoxon Rank. Os níveis de PTX3 foram categorizados e as diferenças entre sobrevivente e não sobreviventes foi analisada por regressão logística binária. A magnitude da associação e as variáveis independentes foi medida pelo Odds Ratio e pelo respectivo intervalo de confiança de 95%.

Finalmente foi realizada uma regressão logística múltipla usando método condicional para determinar as variáveis que foram associadas independentemente com a morte no tempo pós-trauma.

Foi incluído nas análises todas as variáveis que mostraram associações com a mortalidade na análise univariada com um nível de  $p < 0,2$ . A classificação de cutoff foi de 0,5 com máximo de interações de 20. No modelo final de regressão logística múltipla, apresentando valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

A magnitude da associação entre morte e variáveis independentes medidas, foi ajustada pelo Odds Ratio e respectivo intervalo de confiança de 95%. Não foi aplicado ajuste para os testes múltiplos usando critérios. Todos os resultados missing foram claramente descritos nos resultados e tabelas. A análise estatística foi feita utilizando o SPSS 10.0 (Chicago, IL).

### 3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho preenche os pressupostos éticos considerados necessários e suficientes pela “American Medical Association” (Emanuel *et al.*, 2000) para considerar a pesquisa clínica proposta ética, incluindo: valor da pesquisa para aumentar o conhecimento e/ou aprimorar a saúde, validade científica (rigor científico), ética na seleção dos casos, risco-benefício da execução do projeto favorável, revisão pelo comitê de ética, consentimento informado, respeito à privacidade e vontade dos pacientes envolvidos.

Foi obtido termo de consentimento de responsável do paciente para a coleta das amostras de sangue.

O trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (número 163/05).

## 4 ARTIGO ORIGINAL

### MORTALITY OF PATIENTS WITH SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY IS ASSOCIATED WITH SERUM PTX3 LEVELS

Jackson da Silva Gullo,<sup>1</sup> Melina More,<sup>1</sup> Cláudia Carvalho Pestana Silva,<sup>1</sup> Marcelo Schwarzbald,<sup>1</sup> Alexandre Paim Diaz,<sup>1</sup> Flávia Mahatma Schneider Soares,<sup>1</sup> Fernando Cini Freitas,<sup>1,2</sup> José Tadeu Pinheiro,<sup>3</sup> Edelson Flavio Morato,<sup>4</sup> Rui Prediger,<sup>5</sup> Marcelo Neves Linhares,<sup>1,6</sup> Roger Walz<sup>1,6</sup>

1. Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica (NUPNEC), Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.
2. Unidade de Terapia Intensiva, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brasil.
3. Departamento de Análises Clínicas, CCS, UFSC e Núcleo de Avaliação de Reações do Tipo Alérgico a Drogas, HU, UFSC
4. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB, UFSC e e Núcleo de Avaliação de Reações do Tipo Alérgico a Drogas, HU, UFSC
5. Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, Departamento de Farmacologia, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
6. Centro de Epilepsia do Estado de Santa Catarina (CEPESC), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brasil.

**Corresponding author:** Prof. Dr. Roger Walz, M.D.,Ph.D., Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, 3 andar, UFSC, Campus Universitário, Trindade Florianópolis, SC, Brasil.



**Introduction:** Traumatic brain injury (TBI) is a worldwide cause of morbidity and mortality. Pentraxin 3 (PTX3) is a humoral innate immune system component which has been studied as marker for inflammatory, infections or cardiovascular pathologies.

**Objectives:** To investigate the association between the serum levels of PTX3 and the mortality of patients with severe TBI.

**Methods:** The independent association between serum PTX3 levels after the severe TBI (Coma Glasgow Scale, GCS  $\leq$  8) and the mortality at the time of discharge was analyzed in a prospective study of 83 consecutive patients by a multiple logistic regression analysis.

**Results:** The mean age of patients was 35 years and 85 percent were male. The serum PTX3 levels were determined at 18.0 (SD  $\pm$  17.0) hours after the TBI. Patients who died showed a mean serum PTX3 level of 9.95  $\mu$ gm/ml (SD  $\pm$  6.42) in comparison to 5.46  $\mu$ gm/ml (SD  $\pm$  4.87) in the survivors group ( $p = 0.007$ ). After the multiple logistic regression analysis, serum levels of PTX3 higher than 10  $\mu$ gm/ml was 3 times more associated with death than lower levels (Adjusted OR 3.38, CI 95% 1.10 – 10.45,  $p = 0.03$ ). Older age, pupillary abnormalities and lower scores in the GCS were also independently associated with mortality.

**Conclusions:** Serum PTX3 levels after the severe TBI are independently associated with higher mortality at the time of discharge. Our finding suggests that PTX3 may be a useful marker of TBI and its prognosis.

## INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is the leading worldwide cause of morbidity and mortality among young people (1,2,3). TBI is more frequently observed in low- and middle-income countries, including Brazil (3,4,5). After the primary injury related to the trauma itself (contusions, lacerations, hemorrhage), lesions may be aggravated at the pre-hospital level or even after hospital admission due to hemodynamic disturbances (i.e. hypotension), intracranial hypertension, anemia, infections, fever, hypoxia, seizures as well as metabolic and electrolytic disturbances. Different mechanisms including inflammation, receptor-mediated damage, oxidative damage and calcium mediated damage superimposed on the primary injury types (hematoma, contusions and diffuse axonal injury) are involved in the pathophysiology of the TBI (6). The primary damage and the subsequent disturbances may activate both secondary injury and neuroprotective cascades which interact through a complex biochemical network leading to neuronal and glial survival or death due to necrosis and apoptosis (7,8,9,10).

The long pentraxin 3 (PTX3) is a highly conserved component of the humoral innate immune system member (11, 12). PTX3 has been emerged as a novel candidate marker for inflammatory, infections and cardiovascular pathology (13). PTX3 is produced by a variety of cells and tissues, most notably dendritic cells and macrophages, in response to Toll-like receptor (TLR) engagement and inflammatory cytokines. Through interaction with several ligands, including selected pathogens and apoptotic cells, PTX3 play a role in complement activation, pathogen recognition and apoptotic cell clearance (12). Physiologically PTX3 is a protective molecule codified by a polymorphic gene and it plays an important role in innate immunity, inflammation, vascular integrity, fertility, pregnancy and also in the CNS (14). The neuronal members of long pentraxin family constitutively expressed in the CNS including guinea-pig apexin (15,16), rat neuronal pentraxin (NP1) (17), human neuronal pentraxin (NP2) (18) and neuronal activity regulated by pentraxin (NARP) (19) have been proposed to have a neurobiological role. In particular, NP1 and NP2 may be involved in the uptake of the synaptic material during synapse remodeling. NARP has been shown to promote neurite

outgrowth (17,18,19,20). PTX3 is not expressed in the CNS but it is highly inducible there in response to inflammatory signals (21). Experimental findings demonstrated that pentraxin 3 is synthesized in the brain after seizures induced by kainic acid and may exert a protective role in seizure-induced neurodegeneration (22).

Here we investigated the serum levels of PTX3 measured after the severe TBI and its association with the patient mortality at the time of hospital discharge.

## **SUBJECTS AND METHODS**

We included 83 consecutive patients with severe TBI admitted to the intensive care unit of Governador Celso Ramos Hospital between April 2006 and September 2008 with Glasgow coma scale (GCS) score 8 or lower after acute neurosurgical resuscitation. Victims of gunshot injury and patients who evolved to brain death before 24 hours of admission were excluded. This is a public reference hospital for TBI, covering a population of approximately one million people, in the metropolitan area of Florianopolis city. The neurosurgical team, the intensive care unit staff and the research team were the same during all the time of study. The variables were collected using the same standardized protocol previously approved by our Ethics Comitee and informed consent were obtained from the family members.

Death at the time of discharge was the dependent variable. The clinical, demographic, radiological and neurosurgical independent variables analyzed were age, gender, computed tomography (CT) findings (Marshal CT classification and the presence of subarachnoid hemorrhage), respiratory or urinary tract infections during hospitalization, presence of associated trauma (face, spinal, thorax, abdomen or limbs), admission GCS and pupil examination. Face trauma included isolated or combined skin lacerations, visible hematoma and eye lesions. Patients with limb fractures or major articulation lesions of limbs were classified as having limb trauma. Isolated or combined lung contusion, pneumothorax, or hemothorax were considered thoracic trauma. Isolated or combined pneumoperitoneum, hemoperitoneum, or visceral lesions were considered as having abdominal trauma. All the

brain CT findings were classified according to Marshall *et al.* (23) CT analysis was performed before the patient discharge by the same researcher and confirmed by another one, when necessary.

PTX3 serum level was determined for each patient in remnant serum sample from the blood used in the routine laboratory, and stored in aliquots of 250 $\mu$ L at -70C until the biochemical analysis. The time of TBI occurrence and the blood sample collection were determined by one of our investigators. We also analyzed PTX3 levels in ten healthy persons matched by sex and age. Serum PTX3 levels were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. In brief, 96 well-ELISA plates (Nunc MaxiSorp, NY) were coated with 100  $\mu$ l of rat MAb to human PTX3 (MNB4), 700 ng/ml in 100  $\mu$ l coating buffer (15 mM carbonate buffer pH 9.6, Sigma, Saint Louis) and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed three times with 300  $\mu$ l/well of washing buffer (Dulbecco's phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20, Sigma, Saint Louis), and then 300  $\mu$ l of 5% dry milk in washing buffer were added to block nonspecific binding sites. The plates were incubated for 2 hrs at room temperature and then washed three times with washing buffer. About 50  $\mu$ l of recombinant human PTX3 standards (75 pg/ml to 2.4 ng/ml) and serum samples diluted in RPMI 1640 plus 2% BSA (Sigma, Saint Louis) were added in duplicate and incubated for 2 hrs at 37 °C. The plates were rinsed five times with washing buffer then 25 ng/well of biotin-conjugated PTX3 affinity-purified rabbit IgG was added for 1 hr at 37 °C. Wells were then washed five times and incubated with 100  $\mu$ l/well streptavidin-horseradish peroxidase conjugated to dextran backbone (AmDex, Copenhagen) diluted 1:4000 for 1 hr at room temperature. After incubation, the plates were washed five times and added with 100  $\mu$ l/well of chromogen ABTS peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg MD). Absorbance values were read after 15 min at 405 nm in an automatic enzyme-linked immunosorbent assay reader. Both intra- and inter-assay coefficients of variation were <10%. The assay has a sensitivity of 0.15  $\mu$ g/ml.

## Statistical Analysis

A univariate analysis was done to determine the association among the clinical, demographic, radiological, neurosurgical, serum levels of PTX3 and the mortality at the time of discharge. Continuous variables were analyzed by Student “t” test and were also categorized. Categorical variables were analyzed by binary logistic regression. The magnitude of association between death and the independent variables was measured by the crude odds ratio (OR) and respective 95% confidence interval (CI). We also investigated the correlation between the time after TBI and the serum PTX3 level by linear regression analysis.

Thereafter we performed a multiple logistic regression using the forward conditional method to determine the variables that were independently associated with death at the time of discharge. We included in this analysis all the variables which showed associations with the mortality in the univariate analysis with a level of “p” lower than 0.2. The magnitude of association between death and the independent variables was measured by the adjusted odds ratio (OR) and respective 95% confidence interval (CI). In the final model of multiple logistic regression analysis the “p” level lower than 0.05 was considered significant. We did not apply the adjustment for multiple tests using a more stringent criterion for the “p” level to avoid type II error (24). Statistical analysis was done using the SPSS program 10.0 (Chicago, IL).

## RESULTS

The clinical, demographic, radiological, neurosurgical variables and mortality of patients at the time of discharge are shown in table 1. The mean age of patients was 35 years. Eighty-three percent was male and 37% died. The mean time between the TBI and the blood sample collection for PTX3 measurement was 18.2 (SD  $\pm$  17.0) hours (minimum 1

and maximum 72 hours). There were no association between the serum PTX3 levels and the time after TBI (linear regression,  $p = 0.95$ ,  $r$  square lower than 0.001) (data not shown).

There was an association between mortality and age over than 48 years old, in comparison younger patients (OR 3.06, CI 95% 1.02 – 9.16,  $p = 0.04$ ). Presence of limb trauma showed a non-significant trend for lower association with death (OR 0.43, CI 95% 0.14 – 1.33,  $p = 0.14$ ). Admission GCS scores of 3 or 4 were 5 times more associated with death than scores 7 or 8 (Crude OR 5.08, CI 95% 1.60 – 16.04,  $p = 0.001$ ). Admission with anisocoric pupils were 3 times more associated with death (Crude OR 3.06, CI 95% 1.18 – 9.22,  $p = 0.02$ ) than isochoric pupils. Mydriasis was 15 times more associated with death than isocoric pupils (Crude OR 15.0, CI 95% 2.72 – 84.0,  $p < 0.002$ ).

Serum PTX3 levels higher than  $10^3$   $\mu\text{g}/\text{dl}$  was 6 times more associated with death than lower levels (OR 6.18, CI 95% 1.63 – 23.43,  $p = 0.007$ ) (see table 1). Among the 10 controls, eight had PTX3 levels under the detectable level, one had 0.63 and another one 1.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In comparison, the mean serum PTX3 level of patients was 7.13 (SD  $\pm$  5.8)  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and only six had undetectable levels (data not shown).

Table 2 shows the final model of multiple logistic regression analysis that better explain the independent association between the PTX3 levels measured after TBI and death at the time of discharge. Serum levels of PTX3 higher that 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was 3 times more associated with death than lower levels (Adjusted OR 3.38, CI 95% 1.10 – 10.45,  $p = 0.03$ ). There was a non-significant trend for higher association between mortality and age older than 48 years (Adjusted OR 2.57, CI 95% 0.71 – 9.34,  $p = 0.15$ ). The admission GCS lower than 5 was associated with higher mortality (Adjusted OR 3.70, CI 95% 1.25 – 11.00,  $p = 0.02$ ). There was a non-significant trend for an association between the admission anisocoria (Adjusted OR 2.2, CI 95% 0.68 – 7.39,  $p = 0.18$ ) and death. The presence o admission midriatic pupils was 11 times more associated with mortality than isocoric pupils (Adjusted OR 11.25, IC 95% 1.67 – 75.70,  $p = 0.01$ ). The regression model including age, pupillary

examination, GCS and PTX3 levels shows 77.1% of overall correct prediction with the survival and death predicted at 88.5% and 58.1%, respectively. In comparison, the regression model including age, pupillary examination and GCS shows 73.5% of overall correct prediction with the survival and death predicted at 75% and 71.0%, respectively (data not shown).

## **DISCUSSION**

The present work demonstrated that serum levels of PTX3 increase significantly after the severe TB and is independently associated with mortality in severe TBI. We also replicated ours (3) and other previous studies (25) showing that older age, lower GCS and abnormal pupils at admission are independently associated with patients prognosis in TBI.

PTX3 is primarily produced by monocytes, macrophages, dendritic cells, fibroblasts and epithelial cells (12) and experimental findings showed that in normal conditions it is not expressed in the brain. However, seizures induced by the excitotoxic glutamate receptor agonist kainic acid (KA) in rodents induce a significant expression of PTX3 in several brain regions (22). After kainate seizures, mRNA levels rapidly increase, reaching a peak between 6 and 18 h, and then slowly returning to the control level within 1 week. PTX3 expression changes in each cell population within a specified time frame similar in several cortical and sub-cortical areas. It is induced in astrocytes within 6 hours after KA seizures. Eighteen to 48 h later the neuronal populations and leucocytes were strongly immunoreactive only in areas of neurodegeneration (22). One week after seizures, PTX3 staining was not present in cellular elements but it was diffused in the parenchyma. Noteworthy, PTX3 immunoreactive neurons and leucocytes were visible exclusively in the areas of neuronal cell loss (22). Considering that excitatory aminoacids are closely involved in the pathophysiology of TBI, we believe that TBI may also induce the PTX3 expression in the brain. Interestingly enough, patients with isolated TBI showed serum levels of PTX3 similar to those patients who had no

other organ- associated lesions. Moreover, the higher level of serum PTX3 observed in non-survivors in comparison to the survivors probably is not due to imbalances in the distribution of lesions in other organs because this confounding bias was controlled by the multiple logistic regression analysis.

Our data demonstrated that higher levels of PTX3 are associated with mortality in severe TBI, but the study design does not allow us to reach any conclusion if serum PTX3 enhancement in non-survivors is protective, deleterious or only a marker of an unrecognized mechanism related to the patient prognosis. Different signaling pathways can affect PTX3 production depending on the cell type/or stimuli (22). In mice model of heart ischemia and reperfusion NF- $\kappa$ B regulates PTX3 production, whereas its induction by TNF- $\alpha$  in alveolar epithelial cells is mediated by JNK pathway (22). These pathways may cross-talk in a complex biochemical network making the understanding of PTX3 role on TBI only speculative in the clinical scenario of our study. Experimental models of TBI may help to clarify PTX3 involvement at molecular levels.

In conclusion, PTX3 levels enhance significantly after severe TBI. After the corrections for clinical, radiological, neurosurgical variables imbalances between survivors and non-survivors, serum PTX3 levels after severe TBI remain associated with mortality. Our finding suggests that PTX3 may be a promising marker of TBI and its prognosis. The association among serum levels of PTX3 and both early and long-term outcomes evaluated by fine motor skills, cognitive and psychiatric evaluation as well as quality of life aspects are important points to be investigated in patients with TBI.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This work was financed by CNPq (Brazilian Council for Scientific and Technologic Development, Brazil), FAPESC (Foundation for Scientific Research and Technology of Santa Catarina State). The technical support for biological sample collection came from Laboratório Biomédico (Florianópolis) under the Pharm. Saulo Correia de Mello supervision. We acknowledge Dr. Alberto Mantovani from the Research Laboratory in Immunology and Inflammation, Instituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano, and



Department of Translational Medicine, University of Milan (Milan), Italy who gently provided some of the reagents used in this work.

## References

- 1 - Marshall,LF, Becker,DP, Bowers,SA, Cayard,C, Eisenberg,H, Gross,CR, *et al* . The National Traumatic Coma Data Bank. Part 1: Design, purpose, goals, and results. J. Neurosurg. 1983a; 59:276-284.
- 2 - Marshall,LF, Toole,BM, Bowers,SA The National Traumatic Coma Data Bank. Part 2: Patients who talk and deteriorate: implications for treatment. J. Neurosurg. 1983b; 59: 285-288.
- 3- Martins ET, Linhare MN, Sousa DS, Schroeder HK, Meinerz J, Bertotti MM, Gullo J, Hohl A, Dal-Pizzol F, Walz R. Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariated analysis of 748 patients from Florianópolis city. Journal of Trauma . 2009; 67(1):85-90.
- 4 - Koizumi MS, Lebrao,ML, Mello-Jorge,MH, Primerano,V Morbidity and mortality due to traumatic brain injury in Sao Paulo City, Brazil, 1997. Arq Neuropsiquiatr. 2000; 58: 81-89.
- 5- Perel P, Edwards,P, Wentz,R, Roberts,I Systematic review of prognostic models in traumatic brain injury. BMC. Med. Inform. Decis. Mak. 2006; 6, 38.
- 6- Maas AI, Stocchetti N, Bullock R Moderate and severe traumatic brain injury in adults. Lancet Neurol. 2008;7(8):728-741.
- 7 - Friedlander,RM Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. N. Engl. J. Med. 2003; 348: 1365-1375.
- 8 - Graham,DP, Cardon, AL An update on substance use and treatment following traumatic brain injury. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008; 1141: 148-162.
- 9 - LaPlaca,MC, Simon,CM, Prado,GR, Cullen,DK. CNS injury biomechanics and experimental models. Prog. Brain Res 2007;161: 13-26.
- 10- Spaethling JM, Geddes-Klein DM, Miller WJ, von Reyn CR, Singh P, Mesfin M, *et al*. Linking impact to cellular and molecular sequelae of CNS injury: modeling in vivo complexity with in vitro simplicity. Prog Brain Res. 2007;161:27-39.
- 11-Brugger-Andersen T, Ponitz V, Kontny F, Staines H, Grundt H, Sagara M *et al*. The long pentraxin 3 (PTX3): a novel prognostic inflammatory marker for mortality in acute chest pain. Thromb Haemost. 2009;102(3):555-563.
- 12- Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. Annu Rev Immunol. 2010; 28:157-183. Epub 2009 Dec 7.

- 13- Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH, Tracy RP, Psaty, Bruce M. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease and all-cause death: the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(4):594-599. Epub 2009 Jan 22.
- 14-Ortega-Hernandez OD, Bassi N, Shoenfeld Y, Anaya JM. The long pentraxin 3 and its role in autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum.* 2009;39(1):38-54. Epub 2008 Jul 9.
- 15-Reid MS, Blobel CP. Apexin, an acrosomal pentaxin. *J Biol Chem.* 1994; 269(51):32615-32620.
- 16- Noland TD, Friday BB, Maulit MT, Gerton GL, The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins. *J Biol Chem.* 1994; 269(51):32607-32614.
- 17- Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS. Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. *Neuron.* 1995; 14(3):519-526.
- 18-Hsu YC, Perin MS. Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. *Genomics.* 1995; 28(2):220-227.
- 19- Tsui CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Barnes C, Worley PF. Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J Neurosci.* 1996;16(8):2463-2478.
- 20- Kirkpatrick LL, Matzuk MM, Dodds DC, Perin MS. Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *J Biol Chem.* 2000; 275(23):17786-17792.
- 21-Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, Blasi E, Agnello D, Ghezzi P et al. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000; 106(1-2):87-94.
- 22-Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E. et al. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2001;105(1):43-53.
- 23 - Marshall,L.F., Marshall,S.B., Klauber,M.R., Van Berkum,C.M., Eisenberg,H., Jane,J.A., Luerksen,T.G., Marmarou,A., and Foulkes,M.A. (1992). The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J. Neurotrauma* 9 Suppl 1, 287-292.
- 24- Perneger,T.V. (1998). What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 316, 1236-1238.
- 25- Murray,G.D., Butcher,I., McHugh,G.S., Lu,J., Mushkudiani,N.A., Maas,A.I., Marmarou,A., and Steyerberg,E.W. (2007). Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J. Neurotrauma* 24, 329-337.

**Table 1:** Clinical, demographic, radiological and neurosurgical variables at admission and the prognosis of patients.

Variables	All Patients n = 83 (%)	Outcome		Crude OR for death (CI 95%)	p level
		Survivors n = 52 (62.7%)	Non-survivors n = 31 (37.3 %)		
<b>Age (years)</b>					
Mean ( $\pm$ SD)	34.9 (15.23)	32.8 (15.1)	38.4 (16.6)	N.A.	0.10
Between 16 to 48	66 (79.5)	45 (86.5)	21 (67.7)	1.0	
48 or older	17 (20.5)	07 (13.5)	10 (32.3)	3.06 (1.02 – 9.16)	0.04
<b>Gender</b>					
Male	68 (81.9)	44 (84.6)	24 (77.4)	1.0	
Female	15 (18.1)	8.0 (15.4)	07 (22.6)	1.6 (0.52 – 4.96)	0.41
<b>CT findings<sup>a</sup></b>					
Type I injury	03 (3.6)	2.0 (3.8)	01 (3.2)	1.0	
Type II injury	22 (26.5)	17 (32.7)	05 (16.1)	0.59 (0.04 – 7.91)	0.69
Type III injury	13 (15.7)	8.0 (15.4)	05 (16.1)	1.25 (0.89 – 17.65)	0.87
Type IV injury	5.0 (6.0)	4.0 (7.7)	01 (3.2)	0.50 (0.19 – 12.90)	0.67
Evacuated mass lesion	19 (22.9)	12 (23.1)	07 (22.6)	1.17 (0.09 – 15.3)	0.91
No evacuated lesion	19 (22.0)	08 (15.7)	11 (35.5)	2.75 (0.21 – 35.8)	0.44
<b>SAH<sup>a</sup></b>					
No	35 (42.2)	24 (44.2)	12 (38.7)	1.0	
Yes	46 (55.4)	28 (53.8)	18 (58.1)	1.23 (0.49 – 3.08)	0.65
<b>Associated trauma</b>					
No	34 (41.0)	19 (36.5)	15 (48.4)	1.0	
Yes	49 (59.0)	33 (63.5)	16 (51.6)	0.61 (0.25 – 1.52)	0.29
<b>Thorax or Abdomen</b>					
No	64 (77.1)	41 (78.8)	23 (74.2)	1.0	
Yes	19 (22.9)	11 (21.2)	08 (25.8)	1.29 (0.45 – 3.68)	0.63
<b>Face</b>					
No	64 (77.1)	39 (75.0)	26 (83.9)	1.0	
Yes	19 (22.9)	13 (25.0)	05 (16.1)	0.57 (0.18 – 1.82)	0.35
<b>Limb</b>					
No	62 (74.7)	36 (69.2)	26 (83.9)	1.0	
Yes	21 (25.3)	16 (30.8)	05 (16.1)	0.43 (0.14 – 1.33)	0.14
<b>Admission pupils</b>					
Isocoric	28 (33.7)	22 (42.3)	06 (19.4)	1.0	
Anisocoric	24 (28.9)	17 (32.7)	07 (22.6)	3.06 (1.18 – 9.22)	0.02
Midriatic	31 (37.3)	13 (25.0)	18 (58.1)	15.1 (2.72 – 84.0)	0.002
<b>Admission GCS</b>					
7 or 8	43 (51.8)	34 (65.4)	09 (29.0)	1.0	
5 or 6	30 (36.7)	16 (30.8)	14 (45.2)	1.51 (0.43 – 5.32)	0.52
3 or 4	10 (12.0)	2 (3.8)	08 (25.8)	5.08 (1.60 – 16.04)	0.001
<b>PTX3 levels <math>\mu</math>gm/ml</b>					
Mean ( $\pm$ SD)	7.13 (5.88)	5.46 (4.87)	9.95 (6.42)	N.A.	0.001
Lower than 2	20 (24.1)	16 (30.8)	04 (12.9)	1.0	
2 to 10	35 (42.2)	25 (48.1)	10 (32.3)	1.60 (0.43 -5.98)	0.49
Higher than 10	28 (33.7)	11 (21.2)	17 (54.8)	6.18 (1.63 – 23.43)	0.007
<b>Hours after TBI and PTX3 analysis</b>					
Mean ( $\pm$ SD)	18.2 (17.3)	19.3 (17.8)	17.33 (16.58)	N.A.	0.46

<sup>a</sup> The cranial computed tomography (CT) were not analyzed by the research team in 2 patients.

**Table 2:** Independent association between serum PTX3 levels and the mortality of patients with severe TBI.

Variables	Crude OR for Death (95% CI)	<i>P</i> Value	Adjusted OR <sup>a</sup> for Death (95% IC)	<i>p</i> value
<b>Age</b>				
16 to 48 years	1.0		1.0	
Older than 48 years	3.06 (1.02 – 9.16)	0.04	2.57 (0.71 -9.34)	0.15
<b>Admission GCS</b>				
Higher than 4	1.0		1.0	
3 or 4	4.93 (1.89 – 12.86)	0.001	3.70 (1.25 – 11.00)	0.02
<b>Admission Pupils</b>				
Isochoric	1.0		1.0	
Anisochoric	3.06 (1.18 – 9.22)	0.02	2.24 (0.68 – 7.39)	0.18
Midriatic	15.1 (2.72 – 84.0)	0.002	11.25 (1.67 – 75.70)	0.01
<b>PTX3 levels, µgm/ml</b>				
Lower than 10	1.0		1.0	
10 or higher	4.52 (1.71 – 11.95)	0.002	3.38 (1.10 – 10.45)	0.03

<sup>a</sup> OR for death adjusted for age, admission coma Glasgow scale score, admission pupils and serum PTX3 levels.

## CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

Os níveis séricos de PTX3 aumentam significativamente 12, 30 e 70 horas após o TCE grave. Após a correção para assimetrias na distribuição de variáveis clínicas, radiológicas, neurocirúrgicas entre o grupo de pacientes sobreviventes e não-sobreviventes, os níveis elevados de PTX3 estiveram associados à mortalidade de pacientes vítimas de TCE grave. Os achados sugerem que a medida de PTX3 no soro possa vir a ser um marcador promissor para o prognóstico de pacientes com TCE.

A associação entre os níveis séricos de PTX3 e o prognóstico de pacientes mensurado através de uma avaliação mais detalhada incluindo aspectos motores, cognitivos, psiquiátricos e de aspectos da qualidade de vida são importantes pontos para se investigar em pacientes com TCE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chin LS AE, Dipatri AJ, Eisenberg HM. Neurocirurgia. In: Townsend MC JD, Beauchamp D, editors. Sabiston: Tratado de Cirurgia. 17ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 2152-8.
2. Pineda JA, Wang KK, Hayes RL. Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):202-9.
3. Bruns J, Jr., Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia.* 2003;44: 10-22.
4. Marion DS, MC. Tyler-Kabara.EC. Trauma of the nervous system. In: Bradley WG. Daroff RB. Fenichel GM. Jankovic J,editors. *Neurology in Clinical Praxis.* 4ª ed. Philadelphia. USA; 2004. p. 1127-47.
5. Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet.* 2000 Sep 9;356(9233):923-9.
6. Campello Yurgel V, Ikuta N, Brondani da Rocha A, Lunge VR, Fett Schneider R, Kazantzi Fonseca AS, et al. Role of plasma DNA as a predictive marker of fatal outcome following severe head injury in males. *J Neurotrauma.* 2007 Jul;24(7):1172-81.
7. Martins ET, Silva TS, Coutinho M. A study of 596 consecutive cases of severe head trauma from 1994 to 2001 in Florianopolis, Brazil. *RBTI* 2003 15; 1:15-18.
8. Bárcena-Orbe A, Rodríguez-Arias CA, Rivero-Martín B, Canizal-Garcia GM, Mestre-Moreiro C, Calvo-Pérez JC. Overview of head injury. *Neurocirugia (Astur).* 2006 Dec; 17(6):495–518.
9. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Clark MB, Eisenberg HM, Jane JA. A new classification of head injury based on computerized tomography. *Journal of Neurosurgery* 1991; 75:14-20.
10. Koizumi MS, Araújo GL. Escala de Coma de Glasgow - subestimação em pacientes com respostas verbais impedidas. *Acta Paul Enferm* 2005;18(2):136-42.
11. Jennett B et al. Disability after severe head injury: observations on the use of the Glasgow Coma Scale. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatr.* 1981; 44:285-293.
12. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Patologia- Bases Patológicas das Doenças. 7th Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
13. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.* 1990 59: 783–836.
14. Schroeter M, Jander S. T-Cell Cytokines in Injury-Induced Neural Damage and

Repair. *NeuroMolecular Med.* 2005 7(3):183-95.

15. Parham P. *The immune System.* Garland Publishing/Elsevier Science Ltd. 2000.

16. Schmid-Schonbein G. W. *Analysis of Inflammation.* *Annu Rev Biomed Eng.* 2006 8:93-151.

17. Sredni-Kenigsbuch D. *Th1/Th2 Cytokines in Central Nervous System.* *Int J Neurosci.* 2002 Jun 112(6):665-703.

18. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leucocyte migration into the central nervous system, *Nat Rev Immunol.* 2003 Jul 3(7): 569-81.

19. Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, et al, Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock.* 2007 Dec 28(6):668-74.

20. Balasingam V, Yong VW. Attenuation of Astroglial Reactivity by Interleukin-10. *J Neurosci.* 1996 May 1; 16(9):2945–2955.

21. Lai AY, Todd KG. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia.* 2008 Feb 56(3):259-70.

22. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury.* 2007 Dec 38(12):1392-400.

23. Garg SK, Kipnis J, Banerjee R. IFN-gamma and IL-4 differentially shape metabolic responses and neuroprotective phenotype of astrocytes. *J Neurochem.* 2009 Mar 108(5):1155-66.

24. Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, et al, Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock.* 2007 Dec 28(6):668-74.

25. Kirchhoff C, Buhmann S, Bogner V, Stegmaier J, Leidel BA, Braunstein V, et al. Cerebrospinal IL10 concentrations is elevated in non survivors as compared to survivors after severe traumatic brain injury. *Eur J Med Res.* 2008 Oct 27; 13 (10): 464-8.

26. Martins ET, Linhares MN, Sousa DS, Schroeder HK, Meinerz J, Rigo LA, Hohl A, Bertotti MM, Gullo J, Dal-Pizzol F, Walz R. Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianópolis City. *J Trauma.* 2009 Jul;67(1):85-90.

27. Maas A I R, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 2008; 7: 728–41.

29. Lee GW, Lee TH, Vilcek J. TSG-14, A novel TNF-inducible Gene in Human

Diploid Fibroblasts. *Lymphocyte Research* 9:570, 1990.

30. Bottazzi B, et al. A multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3: Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 272:32817-23.1997.

32. Nauta AJ, Bottazzi B., Mantovani A. et al., Biochemical and Functional Characterization of the Interaction between Pentraxin 3 and C1q. *Eur. Journ. Immunol.* 33 465-73, 2003.

33. Inforzato A, Peri G, Doni A. et al. Structure and Function of the Long Pentraxin PTX3 Glycosidic Moety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry* 45: 11540-51, 2006.

34. Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A, et al. *Blood* 2000; 96:4300-6.

35. Pepys, M. B. et al. Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc. Natl Acad.*1994.5602–5606.

36. Doni A, Peri G, Chieppa M. et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur. Journ. Immunol.* 33:2886-93, 2003.

37. Landa C, Bottazzi B, Bastone A. et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* 23:337-66, 2005.

38. Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, et al. Complexity and Complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* 22:551-60, 2005.

39. Polentarutti N, Picardi G, Basile A, et al. Interferon Gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in Human monocytes. *Eur. Journ. Immunol.* 28:496-501, 1998.

40. Perrier P, Martinez FO, Locati M, et al. Distinct transcriptional programs activated by interleukin 10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of B cell-activating chemokine, CXCL13. *J. Immunol.* 172:7031-42, 2004.

41. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system of diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*25:677-86, 2004.



## APÊNDICES

## APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO ALUNO DURANTE O PERÍODO DE

DEMAIS ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS E OS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

1 - Martins ET, Linhares MN, Sousa DS, Schroeder HK, Meinerz J, Rigo LA, Hohl A, Bertotti MM, Gullo J, Dal-Pizzol F, Walz R. **Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariated analysis of 748 brazilian patients from Florianópolis City.** J Trauma. 2009 Jul;67(1):85-90. (índice de impacto – 2,342)

2- Hohl A, Daltrozo J, Girardi C P, Gullo J S, Bernardini J D, Coral MHC, Walz R. **Avaliação tardia do eixo hipofisário-gonadal em pacientes adultos que sofreram traumatismo crânio-encefálico grave entre os anos de 2000 e 2004 na Grande Florianópolis.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, Vol 53, No 8 (2009). (Indexado no Pub Med – sem índice de Impacto no ISI)

3 – Hohl A, Gullo JS, Silva CCPS, Bertotti MM, Felisberto F, Souza B, Petronilho F, Soares FMS, Prediger R, Pizzol FD, Linhares MN, Walz R. **Plasmatic Levels of Lipid and Protein Peroxidation and Mortality in Severe Head Injury: a multivariated analisys.** Submetido Critical Care (índice de impacto – 4,553)