

Carla Oliveira de Oliveira¹, Nilo Ikuta², Andrea Regner³

Biomarcadores prognósticos no traumatismo crânio-encefálico grave

Outcome biomarkers following severe traumatic brain injury

1. Pós-graduanda do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA - Canoas (RS), Brasil.

2. Doutor, Professor Assistente do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA- Canoas (RS), Brasil.

3. Doutora, Professora Adjunta dos Programas de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular e em Genética e Toxicologia Aplicada da Universidade Luterana do Brasil– ULBRA- Canoas (RS), Brasil.

RESUMO

O trauma é a principal causa de morte em pessoas entre 1 e 44 anos de idade. O traumatismo crânio-encefálico é o principal fator determinante da mortalidade e da morbidade decorrentes do trauma. A predição do prognóstico é um dos principais problemas associados ao traumatismo crânio-encefálico grave, já que o valor preditivo variável da avaliação clínica complica a identificação de pacientes com maior risco para desenvolvimento de lesões secundárias e desfecho fatal. Devido a estas questões, há considerável interesse no desenvolvimento de biomarcadores que reflitam a gravidade do dano cerebral e que se correlacionem com mortalidade e prognóstico funcional em longo prazo. As proteínas S100B e enolase neuronal específica estão entre os marcadores mais estudados para este fim, mas há também

estudos com a proteína glial fibrilar ácida, a creatinina quinase cerebral, a proteína mielina básica, o ácido desoxirribonucleico plasmático, a proteína de choque quente 70, o fator von Willebrand, as metaloproteinases, o fator neurotrófico derivado do cérebro, dentre outros. Evidências sugerem que a inflamação, o estresse oxidativo, a excitotoxicidade, as respostas neuroendócrinas e a apoptose têm um importante papel no desenvolvimento de lesões secundárias. Marcadores envolvidos nestes processos também estão sendo estudados no traumatismo crânio-encefálico. Revisamos estes marcadores, muitos dos quais apresentam resultados promissores para uma futura aplicação clínica.

Descritores: Traumatismos encefálicos/mortalidade; Traumatismos encefálicos/complicações; Prognóstico; Marcadores biológicos/sangue

Recebido do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA- Canoas (RS), Brasil.

Submetido em 26 de Agosto de 2008
Aceito em 3 de Dezembro de 2008

Autor para correspondência:

Carla Oliveira de Oliveira
Rua Rodolfo Sinch, 320, 504
CEP 91050-350 - Porto Alegre (RS),
Brasil.
Fone: 51 33485093 - Fax: 51 32229844
E-mail: carla.oliveiradeoliveira@gmail.com

INTRODUÇÃO

O trauma é a principal causa de morte em pessoas entre 1 e 44 anos. O traumatismo crânio-encefálico (TCE) é o principal determinante de morbidade, incapacidade e mortalidade dentro deste grupo.⁽¹⁾ O TCE grave está associado a uma taxa de mortalidade de 30 a 70%,⁽²⁾ e a recuperação dos sobreviventes é marcada por seqüelas neurológicas graves e por uma qualidade de vida muito prejudicada.⁽³⁾

A gravidade do TCE é comumente determinada utilizando-se a Escala de Coma de Glasgow (GCS - *Glasgow Coma Scale*). Esta escala é obtida pela observação de três parâmetros: abertura ocular, resposta verbal e resposta motora.⁽³⁾ O TCE é categorizado como grave com uma pontuação na GCS de 3 a 8, como moderado com GCS de 9 a 12 e como leve com GCS de 13 a 15.⁽⁴⁾ A GCS tem sido usada como um dos mais importantes preditores de desfecho no TCE, embora outras variáveis, como idade, respostas motoras anormais, achados tomográficos, anormalidades pupilares e episódios de hipóxia e hipotensão

tenham sido subseqüentemente introduzidas na tentativa de uma determinação mais acurada do prognóstico. Muitas vezes, há dificuldade na determinação do escore da GCS na sala de emergência devido a intubação ou sedação durante o atendimento pré-hospitalar.⁽⁵⁾ A interferência da intoxicação alcoólica na diminuição da pontuação na GCS é controversa.⁽⁶⁾

A escala funcional de Glasgow (GOS, *Glasgow Outcome Scale*) é a escala mais usada para avaliação do prognóstico funcional após o TCE.⁽⁷⁾ Ela tem cinco categorias, de morte até bom prognóstico funcional, e é normalmente determinada 3, 6 e 12 meses após o trauma.⁽⁸⁾ Contudo, ela apresenta importantes deficiências e a avaliação precoce do dano cerebral pode ser muito difícil durante a estada do paciente na unidade de terapia intensiva (UTI).⁽⁷⁾

A tomografia computadorizada (TC) é o exame de imagem de escolha no manejo da vítima de TCE na sala de emergência. Através desse exame, hematomas podem ser rapidamente diagnosticados, favorecendo, quando indicado, tratamento cirúrgico precoce.^(9,10) A TC tem, no entanto, baixa sensibilidade no diagnóstico de lesões não hemorrágicas, o que explica a pobre correlação, muitas vezes observada, entre os achados tomográficos e a pontuação na GCS.⁽⁹⁾ A TC deve ser repetida se houver deterioração do quadro clínico, uma vez que lesões já diagnosticadas podem aumentar ou novas lesões podem se desenvolver, principalmente nas primeiras 12 a 24 horas após o trauma.⁽¹⁰⁾ Marshall et al.⁽¹¹⁾ desenvolveram uma classificação para os achados tomográficos no TCE. As alterações tomográficas usadas para a classificação são: edema (avaliado pela compressão ou ausência de cisternas), volume de lesões de alta ou mista densidade (coleções hemáticas), desvio de linha média e evacuação de lesão de massa.⁽⁸⁾ Vários estudos confirmaram o valor preditivo de prognóstico da classificação de Marshall em pacientes com TCE.⁽¹²⁾

A recuperação após o TCE está relacionada à gravidade do dano inicial (lesão primária) e à presença de danos secundários.⁽¹³⁾ Uma causa importante de lesão secundária é o desenvolvimento de hipertensão intracraniana (HIC), o que pode ser ocasionado por hematoma intracraniano ou edema cerebral. O objetivo tradicional do manejo dos pacientes com TCE tem sido limitar o dano secundário pela manipulação da pressão intracraniana e da pressão de perfusão cerebral assim como evitar fatores agravantes, como hipoxemia e hipotensão, a fim de melhorar o prognóstico destes pacientes.⁽³⁾

A grande variedade de condições associadas e o valor preditivo variável da avaliação clínica complicam a identificação de pacientes com maior risco para o desenvolvimento de HIC e desfecho fatal na fase inicial da lesão

traumática.⁽¹⁴⁾ Devido a essas questões, há considerável interesse no desenvolvimento e posterior aplicação de um marcador bioquímico que reflita a gravidade do dano cerebral e que se correlacione com desenvolvimento de lesão secundária, prognóstico a curto prazo (mortalidade) e prognóstico funcional a longo prazo.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

Um bom biomarcador de lesão cerebral deve ser sensível e ter alta especificidade para tecido cerebral. Deve ser medido em soro, pois líquido céfalo-raquidiano nem sempre é disponível, e, no TCE grave, ocorre uma ruptura da integridade da barreira hemato-encefálica.⁽¹⁸⁾ Deve ter pouca variabilidade relacionada a sexo e idade. Deve, também, ter valor clínico em pacientes com politraumatismo associado. Muitas proteínas sintetizadas nas células da astróglia ou nos neurônios têm sido propostas como marcadores de dano celular do SNC.⁽¹⁶⁾ Marcadores relacionados aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em lesão secundária também estão sendo pesquisados.

MARCADORES TECIDUAIS

S100B

A S100 é uma pequena proteína citosólica dimérica, do tipo ligadora de cálcio.^(15,17) Ela tem peso aproximado de 21kDa⁽¹⁹⁾ e existe em várias formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β . A forma $\beta\beta$, que é chamada de S100B, é encontrada na astróglia e células de Schwann. A S100B é altamente específica para tecido do sistema nervoso central, assim como para células de melanoma maligno.⁽¹⁵⁾ Contudo, também pode ser encontrada em outros tecidos, como o adiposo.⁽¹⁹⁾

O aparecimento da S100B no soro pode indicar dano cerebral e aumento na permeabilidade da barreira hemato-encefálica. O pico máximo de concentração ocorre após 20 minutos, sendo ela metabolizada no rim e excretada na urina (meia-vida aproximada entre 30 e 113 minutos).⁽²⁰⁾ Pode ser medida em sangue arterial ou venoso, não é afetada por hemólise, e mantém-se estável por horas, sem necessidade de centrifugação e congelamento imediatos da amostra.⁽¹⁵⁾ Níveis elevados de S100B após TCE também podem ser medidos no líquor.⁽²¹⁾ A variabilidade da medida de S100B relacionada a sexo e idade não é significativa.⁽¹⁶⁾

Níveis elevados de S100B têm sido relatados após TCE, acidente vascular encefálico, hemorragia subaracnóide e no pós-operatório de cirurgia cardíaca, quando evolui com complicações neurológicas.⁽¹⁵⁾ A S100B também se mostrou elevada em pacientes com choque hemorrágico, estando relacionada com a gravidade do choque e hipoperfusão.⁽²²⁾ Os mecanismos básicos que levam ao aumento sérico da S100B no TCE permanecem desconhecidos.

Não está claro se a liberação da proteína depende de dano celular irreversível ou se pode ocorrer após lesão menos severa. Há evidências experimentais de que a secreção de S100B pelos astrócitos possa ser um processo ativo.⁽¹⁶⁾

No TCE grave, a S100B correlaciona-se com desfecho a curto prazo (morte ou sobrevida), prognóstico funcional em 6 meses e com critérios de gravidade de TCE, como o escore de Marshall e o ISS.^(15,23,24) Os níveis séricos de S100B estimados nas primeiras horas após TCE grave mostraram-se ser melhor preditores de prognóstico a longo prazo avaliado pela escala de GOS do que o GCS e a escala tomográfica de Marshall.⁽²⁵⁾ Como a S100B tem meia-vida de aproximadamente 2 hs, seus valores aumentados devido ao dano cerebral primário devem retornar aos níveis basais dentro de 12 a 24 horas.⁽¹⁵⁾ Portanto, o acompanhamento diário da dosagem de S100B tem grande relevância clínica, pois níveis de S100B em elevação ou persistentemente altos sinalizam dano cerebral secundário.⁽²¹⁾ A S100B é um marcador sensível para prever precocemente o desenvolvimento de HIC.⁽¹⁴⁾

Níveis aumentados de S100B foram detectados em pacientes com politrauma sem TCE.^(26,27) Neste contexto, avaliamos o papel da S100B sérica como um marcador preditivo de desfecho fatal no TCE severo, tanto isolado quanto associado a politraumatismo, e a S100B mostrou-se um biomarcador sensível de desfecho fatal tanto em pacientes com TCE isolado quanto em pacientes com TCE associado a politrauma.⁽⁷⁾

Enolase neuronal específica

Juntamente com a S100B, a enolase neuronal específica (NSE) é considerada um dos marcadores mais promissores de dano cerebral. A enolase é uma enzima glicolítica que converte 2-fosfo-D glicerato em fosfoenolpiruvato. É funcionalmente ativa como um heterodímero formado por subunidades α , β e γ . As isoenzimas enolases neurais específicas estão presentes quase que exclusivamente no citoplasma dos neurônios (isoenzima γ - γ) e células neuroendócrinas (isoenzima α - γ).⁽²⁸⁾ A massa molecular da NSE é de 78kDa e sua meia-vida biológica é provavelmente superior a 20 horas.⁽¹⁶⁾

A NSE é o único marcador que avalia diretamente dano funcional aos neurônios. Ela é liberada passivamente por destruição celular⁽²⁸⁾ e suas concentrações aumentadas, após o dano neural, podem ser mensuradas em sangue periférico ou líquor.⁽²⁹⁾ A especificidade da NSE é alta e a variabilidade relacionada a sexo e idade é baixa.⁽¹⁶⁾ Um dos principais problemas associados com seu uso como marcador de dano cerebral é a hemólise. Os eritrócitos contêm grande quantidade de NSE e a hemólise pode, portanto,

causar um marcado aumento de NSE no sangue.⁽²⁸⁾

Níveis de NSE aumentados foram encontrados no sangue e no líquor de pacientes com acidente vascular encefálico, hemorragia intracerebral e após ressuscitação cardio-pulmonar.⁽³⁰⁾ A NSE também aumenta e se associa com lesão cerebral em pacientes com sepse grave e choque séptico.⁽³¹⁾ Células tumorais nos APUDomas, neuroblastomas e carcinomas de pequenas células pulmonares são capazes de produzir NSE e elevar os níveis séricos desta proteína. Por essa razão, a dosagem sérica de NSE tem sido estabelecida como um marcador sérico diagnóstico e prognóstico no manejo clínico dessas neoplasias.⁽³²⁾

Concentrações séricas elevadas de NSE são encontradas no TCE, se correlacionando com a gravidade da lesão.⁽²⁹⁾ No TCE grave, a NSE sérica correlaciona-se com desfecho clínico.⁽²⁴⁾ Normalmente, ela aumenta nas primeiras 12 horas após o trauma e então diminui nas próximas horas e dias. Aumentos secundários podem ocorrer em pacientes que evoluem com desfecho fatal. A presença de correlação da NSE com os níveis da GCS e achados tomográficos é controversa. Os estudos que relacionam a dosagem de NSE com a pressão intracraniana (PIC) e com desfecho funcional a longo prazo também mostram resultados conflitantes.⁽¹⁶⁾ A NSE também pode estar elevada em pacientes com politrauma sem TCE (documentado por TC).⁽²⁸⁾

Proteína glial fibrilar ácida

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP - *Glial Fibrillary Acidic Protein*) é uma proteína filamentar intermediária monomérica, com massa molecular aproximada entre 40 e 53 kDa.^(16,18) Representa a maior parte do citoesqueleto astrogliar e não é encontrada fora do sistema nervoso central, sendo, portanto, altamente específica para tecido cerebral.⁽¹⁸⁾

Estudos demonstram a utilidade de mensurar a GFAP no líquor como um indicador específico de anormalidade patológica do SNC.^(16,24) Níveis elevados de GFAP no sangue são encontrados após acidente vascular encefálico, correlacionando-se com prognóstico funcional.⁽³³⁾

A GFAP é liberada na corrente sanguínea logo após o TCE. Ela relaciona-se com o grau de gravidade do TCE, com a classificação de Marshall e a presença de HIC. A GFAP é mais elevada em pacientes com desfecho primário fatal e com pior desfecho neurológico, avaliado pelo GOS. A GFAP não é liberada no politrauma sem TCE.⁽¹⁸⁾

Creatina-quinase BB

A creatinina quinase isoenzima cerebral (CKBB - *creatine kinase brain isoenzyme*) é uma isoforma de creatina-quinase, presente no sistema nervoso central. O cérebro é

rico nas isoformas CKBB e CK-mitocondrial e é desprovido de CKMB e CKMM, encontradas, respectivamente, no músculo cardíaco e no músculo esquelético.⁽³⁴⁾ A massa molecular da CKBB é de 40-53 kDa.⁽¹⁶⁾

A CK-BB está localizada nos astrócitos e é liberada quando há lesão anatômica no tecido cerebral. Seus níveis séricos aumentam durante as primeiras horas após o trauma e então caem rapidamente, a menos que ocorra liberação continuada da enzima. A CKBB está presente em outros órgãos, como o intestino grosso, a próstata, o pâncreas, o útero, o fígado e o baço. Não há CKBB em hemácias e a concentração desta enzima no soro é baixa em condições fisiológicas.⁽¹⁶⁾

Várias situações de lesão cerebral, como parada cardíaca e hemorragia subaracnóide, podem levar a liberação de CKBB no liquor.⁽³⁴⁾ Níveis séricos elevados de CKBB também são encontrados em adenocarcinomas de próstata, mama, ovário, cólon, outros adenocarcinomas do trato gastrointestinal e em carcinoma anaplásico de pequenas células pulmonares.⁽³⁵⁾

No TCE grave, estudos mostram correlação do escore de gravidade avaliado pela GCS com níveis séricos de CKBB. No entanto, há controvérsias sobre a especificidade e a sensibilidade da determinação sérica de CKBB como um preditor de lesão intracraniana.⁽¹⁶⁾

Fator neurotrófico derivado do cérebro

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor*) é uma molécula chave na neuroplasticidade.⁽³⁶⁾ Ele é expresso em múltiplos tipos celulares, incluindo os neurônios e células da glia. A expressão aumentada do BDNF no sistema nervoso central, em resposta a vários estímulos, sugere um papel neuroprotetor para esta neurotrofina. Particularmente, respostas inflamatórias parecem estar envolvidas na expressão aumentada de BDNF.⁽³⁷⁾

O BDNF vem sendo pesquisado em várias desordens neurológicas e psiquiátricas. No TCE, estudos experimentais em ratos têm demonstrado aumentos no RNAm de BDNF no hipocampo, dentro das primeiras 24 horas após o trauma.⁽³⁶⁾ Estudamos, então, os níveis séricos de BDNF em pacientes vítimas de TCE grave. Encontramos níveis séricos elevados de BDNF nas primeiras horas após o TCE, havendo correlação dos níveis séricos de BDNF com desfecho fatal em pacientes com TCE grave isolado.⁽³⁸⁾

Proteína mielina básica

A proteína mielina básica (MBP - *Mielin Basic Protein*) é uma proteína específica da mielina, com peso molecular

de 18.5kDa. Pode ser liberada no sangue após dano cerebral ou em doenças desmielinizantes.⁽¹⁶⁾ Concentrações séricas e líquóricas elevadas de MBP foram encontradas em crianças com suspeita de TCE infligido.⁽³⁹⁾ A MBP mostrou-se elevada em pacientes com TCE grave, relacionando-se com o grau de gravidade e com mortalidade.⁽¹⁶⁾

MARCADORES DE EXCITOTOXICIDADE E PROTEÓLISE

A excitotoxicidade celular é um evento chave na fisiologia do TCE. Como está bem documentado que o aminoácido excitatório glutamato é rapidamente liberado após dano celular e que altas concentrações de glutamato levam a despolarização de células vizinhas, acredita-se que a liberação do glutamato é o evento sentinela na lesão por excitotoxicidade.⁽⁸⁾ Parte deste processo é mediada pelo receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA - *N-methyl-D-aspartate*).^(3,40)

O influxo de cálcio para a célula desencadeia reações que ativam intracelularmente enzimas cálcio-dependentes. A caspase-3 é um membro da família das caspases das cisteína proteases, que pode induzir mecanismos de apoptose. Calpaínas são cisteína proteases cálcio-ativadas, historicamente associadas a morte celular necrótica, mas também implicadas nos mecanismos de apoptose. Tanto aumentos de caspase-3 quanto de calpaínas já foram documentados *in vivo* após TCE. A α -espectrina é o principal substrato de atuação das calpaínas e das caspase-3 cisteína proteases e os produtos de degradação da α -II-espectrina também podem se configurar como biomarcadores no contexto do TCE.⁽⁴¹⁾ No liquor, Pineda et al.⁽⁴²⁾ documentaram aumento das concentrações dos produtos de degradação da α -II-espectrina, os quais se correlacionaram com gravidade da lesão, achados tomográficos e desfecho funcional após TCE grave. Os produtos de degradação da α -II-espectrina gerados pela ação da caspase-3 tiveram uma curva temporal de liberação diferente dos da calpaína, o que sugere que tanto mecanismos de morte celular necróticos quanto apoptóticos são ativados em humanos após o TCE, mas em diferentes pontos temporais. Raghupathi⁽⁴³⁾ sugere que os mecanismos de morte celular após TCE podem representar um *continuum* entre as vias apoptóticas e necróticas.

MARCADORES DE MORTE CELULAR

Marcadores de apoptose

Evidências crescentes têm demonstrado que a apoptose ocorre após o TCE.⁽⁴¹⁾ O início da morte celular apoptó-

tica pode ser ativado por duas vias distintas, normalmente referidas como vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é iniciada pela liberação de citocromo c a partir do espaço intermembrana da mitocôndria para o citosol, levando a ativação de uma cascata de caspases e à amplificação do sinal apoptótico. O citocromo c mostrou-se elevado no liquor de crianças com TCE.⁽⁴⁴⁾ Em contraste, a via extrínseca pode ser ativada pela ligação a um receptor Fas/Apo-1/CD95 de superfície celular transmembrana, receptor-1 de fator de necrose tumoral (TNF-1), DR3, DR4 e DR5 e seus ligantes correspondentes.^(45,46) O ligante Fas (FasL) liga-se ao receptor Fas, resultando em multimerização, recrutamento de moléculas adaptadoras e a formação do complexo ativador de caspases. O Fas/FasL é um regulador chave da apoptose.⁽⁴⁷⁾ O Fas também pode ocorrer em uma forma solúvel (sFas) destituído de uma região transmembrana que pode prevenir as células da apoptose FasL-induzida.⁽⁴⁸⁾ Muitas linhas de evidência sugerem que os receptores de apoptose participam da morte neural após lesão ao SNC.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ Nosso grupo de pesquisa avaliou o papel da sFas e do TNF- α como marcadores preditivos de desfecho fatal em homens adultos com TCE isolado. Detectamos níveis elevados de sFas e TNF- α séricos nas vítimas de TCE grave, contudo não houve correlação entre os níveis elevados e desfecho fatal.⁽⁵²⁾

Ácido desoxirribonucléico plasmático

A dosagem de ácido desoxirribonucléico (DNA) plasmático no soro ou plasma para diagnóstico clínico, estudo de prognóstico e monitoramento de uma variedade de condições tem sido investigada. Sequências de DNA derivadas de tumores, de fetos e de doadores têm sido detectadas no plasma e no soro de pacientes com câncer, de mulheres grávidas e pacientes transplantados, respectivamente.⁽⁵³⁻⁵⁵⁾

Aumentos significativos de DNA circulante têm sido detectados no plasma de pacientes traumatizados e têm sido demonstrado como um promissor biomarcador para estratificação de gravidade no trauma. O aumento nas concentrações de DNA plasmático foi correlacionado com grau de gravidade e o desenvolvimento de complicações pós-traumáticas.^(56,57) Concentrações elevadas de DNA plasmático também foram relacionadas à gravidade de acidentes vasculares encefálicos.⁽⁵⁸⁾

O mecanismo pelo qual o DNA livre circulante aumenta após o trauma não está estabelecido. As altas concentrações observadas muito precocemente após lesão sugerem que o DNA extracelular se origine do dano ao tecido (necrose), enquanto mecanismos de apoptose podem contribuir para aumentos persistentes, além da redu-

ção (clearance) de DNA prejudicada, provavelmente por comprometimento dos órgãos responsáveis em função da inflamação sistêmica.⁽⁵⁷⁾

Nosso grupo publicou estudo avaliando o papel da dosagem de DNA plasmático como um marcador preditivo de desfecho fatal em vítimas de TCE grave. Demonstramos que concentrações significativamente elevadas de DNA plasmático 35.7 \pm 5.2 h após o trauma correlacionam-se com mortalidade. Não encontramos correlação entre as concentrações de DNA e a presença de lesões extracranianas associadas.⁽⁵⁹⁾

MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Resposta inflamatória sistêmica intensa, afetando tanto tecido cerebral traumatizado quanto sadio, é freqüente no TCE. A resposta de estresse inflamatório inclui ativação do complemento e supra-regulação de moléculas de adesão no endotélio de vasos cerebrais associada com acúmulo de neutrófilos e produção de citocinas.⁽⁶⁰⁾ O papel dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento da lesão secundária tem sido investigado. Uma variedade de mediadores está implicada, incluindo citocinas.⁽³⁾ Entre as citocinas, o interesse está particularmente focado na interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF α), na interleucina 6 (IL-6) e na interleucina 8 (IL-8).^(3,20,60)

A interleucina-8 (IL-8) é considerada uma das principais citocinas envolvidas na patofisiologia do TCE. Ela é produzida por vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, células endoteliais, astrócitos e células da micróglia. A liberação de IL-8 é estimulada por outras citocinas, como a IL-1, e por hipóxia, isquemia e reperfusão, os quais são os mecanismos básicos do estresse oxidativo pós-traumático. Numerosos estudos experimentais indicam que a IL-8 tem um papel crucial na resposta inflamatória ao estresse no TCE.⁽⁶⁰⁾ Estudos em humanos também sugerem que os níveis plasmáticos de IL-8 possam ser um parâmetro preditivo de mortalidade em TCE grave isolado.^(20,60)

Os astrócitos e a micróglia, logo após o trauma, liberam IL-1 β e TNF α , levando a uma liberação adicional de citocinas e à produção de mediadores do sistema imune periférico. Estudos clínicos têm demonstrado níveis elevados de TNF α em pacientes com TCE.^(3,52)

O papel da IL-6 é mais ambíguo já ela tem tanto ação pro- quanto antiinflamatória. Níveis elevados de IL-6 no plasma e no líquor são encontrados após TCE.⁽³⁾ A IL-6, por estimular a secreção de vasopressina, pode estar envolvida na patogênese da síndrome de secreção inapropriada de hormônio anti-diurético (ADH – antidiurético hormônio) após o TCE.⁽⁶¹⁾

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo parece ser um evento chave na degeneração neuronal pós TCE, quando um aumento nos radicais livres leva a oxidação proteica, peroxidação lipídica e a danos no DNA.⁽³⁶⁾ Radicais livres são compostos altamente reativos, como o superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico.⁽³⁾ Eles são produzidos durante o metabolismo aeróbico normal e, em concentrações fisiológicas, não causam efeitos destrutivos na célula. Contudo, na fase aguda do TCE, associada com hipoperfusão e isquemia celular, concentrações aumentadas de radicais livres podem causar instabilidade estrutural de muitos constituintes moleculares da célula. O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido a sua alta demanda de oxigênio, intensa produção de radicais livres e altos níveis de metais de transição, como o ferro, que podem catalizar a produção de radicais livres. Além disso, as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos polinsaturados, os quais são fonte para as reações de peroxidação lipídica.⁽⁶²⁾ A peroxidação lipídica das membranas pelos radicais livres ocorre comumente nos pacientes com TCE. A membrana torna-se disfuncional, podendo ocorrer lise e morte celular.⁽⁸⁾ Os radicais livres também podem lesar células endoteliais, contribuindo para edema vasogênico e citotóxico.⁽³⁾ Quando os tecidos são expostos a estresse oxidativo, a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes são aumentadas. A superóxido dismutase (SOD – *superoxide dismutase*) e a glutathione peroxidase (Gpx – glutathione peroxidase) são enzimas antioxidantes cerebrais. A atividade destas enzimas tem se mostrado alterada em estudos com TCE.^(63,64)

MARCADORES DE LESÃO VASCULAR

O fator von Willebrand (VWF – *Von Willebrand Factor*) é um conhecido marcador de lesão endotelial, sendo que sua concentração aumenta em resposta a vários estímulos.⁽⁶⁵⁾ Esse fator é uma proteína adesiva que promove a iniciação e progressão da formação do trombo no local de dano vascular, por interação com componentes da matriz extracelular e receptores de plaquetas.⁽⁶⁶⁾ Estudos recentes têm sido feitos com intuito de correlacionar níveis plasmáticos de VWF com o prognóstico no trauma. Yokota et al.⁽⁶⁵⁾ realizaram um estudo relacionando dois marcadores, a trombomodulina e o VWF, com o TCE grave. Concluíram que ambos são bons indicadores de dano cerebral e de ativação cerebral no trauma. Estudo que avaliou a coagulação e fibrinólise em crianças pós-TCE, evidenciou aumento da hipercoagulabilidade nas primeiras 24 horas, com aumento significativo do VWF e fibrinogênio, com

pico na segunda semana.⁽⁶⁷⁾ Estudamos o papel do VWF como potencial marcador prognóstico em pacientes que sofreram TCE grave, comparando seus níveis plasmáticos com critérios diagnósticos clínicos e de imagem e com desfecho a curto prazo (morte ou sobrevivência). Nosso estudo mostrou que os níveis plasmáticos de VWF aumentaram significativamente em indivíduos que sofreram TCE grave e que se correlacionaram com a pontuação na classificação de Marshall, sugerindo que o VWF possa ser um marcador de prognóstico desfavorável.⁽⁶⁸⁾

As metaloproteinases de matriz (MMPs - *Matrix Metalloproteinases*) são endopeptídeos zinco-dependentes, capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, como o colágeno, as fibronectinas e as elastinas. Durante o desenvolvimento e fisiologia normais da célula, as metaloproteinases ativadas são requeridas para degradar moléculas de matriz extracelular, permitindo a migração celular.⁽⁶⁹⁾ Estudos experimentais têm mostrado que os níveis de MMP-9 aumentam após o TCE, degradando componentes da lâmina basal e rompendo a barreira hemato-encefálica.⁽⁷⁰⁾ Em estudos com camundongos, Wang et al.⁽⁷¹⁾ demonstraram que os níveis de MMP-9 após TCE apresentam elevação que persiste por até uma semana e que esta elevação também ocorre no hemisfério contralateral, sugerindo que, após o trauma, alterações no estado cerebral não estão restritas à zona traumatizada. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que zonas de fraca atividade apresentavam um nível limitado de MMP-2, sugerindo que pequenas elevações de MMP-2 podem ocorrer, em contraste com os estudos relacionados com isquemia encefálica, onde grande elevação da atividade da MMP-2 é encontrada.⁽⁷¹⁾ Suehiro et al.⁽⁷⁰⁾ encontraram níveis elevados de MMP-9 em pacientes com TCE, na fase aguda, os quais se correlacionaram com níveis elevados de IL-6, sugerindo que a MMP-9 pode ter um importante papel no dano por TCE e que está associada com eventos inflamatórios pós-TCE.

O papel da endotelina 1 (ET-1), um peptídeo vasoconstritor muito potente, na deterioração da perfusão cerebral após o trauma ainda é incerta.⁽⁷²⁾ Pode representar uma manifestação celular de falência de mecanismos autoregulatórios.⁽³⁾ Maier et al.⁽⁷²⁾ mostraram que ocorre um aumento dos níveis séricos e líquidos de ET-1 em pacientes com TCE grave na fase aguda.

PROTEÍNAS DE ESTRESSE CELULAR

As proteínas de choque quente (HSP - *heat shock protein*) são moléculas altamente conservadas que têm um importante papel no *folding* e *unfolding* ou translocação

de proteínas, assim como na montagem e desmontagem de complexos proteicos. Devido a estas funções auxiliares, algumas Hsps têm sido denominadas de chaperones moleculares, por protegerem as células do dano por estresse ambiental. As Hsps são denominadas de acordo com seu peso molecular. A família Hsp70kDa regula processos celulares em condições normais ou de estresse. No cérebro, a Hsp70 pode ser induzida por uma variedade de estímulos patológicos, incluindo isquemia, excitotoxicidade e respostas inflamatórias.⁽⁷³⁾

Pittet et al.⁽⁷⁴⁾ demonstraram que a Hsp72 (constituente da família Hsp70) pode ser detectada no soro de pacientes com trauma grave dentro de 30 minutos após o trauma e que níveis elevados se associam com desfecho favorável após o trauma. Recentemente, investigamos o papel da proteína Hsp70 como marcador preditivo de mortalidade no TCE grave em homens. Demonstramos que níveis séricos elevados de Hsp70 até 20 horas após o TCE grave se correlacionam com desfecho fatal, sugerindo que a Hsp70 sérica possa ser um promissor biomarcador para casos de TCE grave.⁽⁷³⁾

MARCADORES NEUROENDÓCRINOS

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que o hipopituitarismo é uma complicação comum do TCE. Entre 23 e 69% dos pacientes demonstram algum grau de hipopituitarismo durante os primeiros 12 meses após o TCE.⁽⁷⁵⁾ A deficiência de hormônio de crescimento (GH - *growth hormone*) é a deficiência hipofisária mais comum induzida por TCE, tanto isoladamente quanto associado com outras deficiências hipofisárias.⁽⁷⁶⁾ Depois, as deficiências de hormônio luteinizante (LH - *luteinizing hormone*) e hormônio folículo-estimulante (FSH - *follicular stimulating hormone*) são significativamente mais comuns do que as deficiências de hormônio adenocorticotrófico (ACTH - *adrenocorticotropic hormone*), as quais são significativamente mais comuns de que as deficiências de hormônio estimulante da tireóide (TSH - *thyroid stimulating hormone*).⁽⁷⁷⁾

A glândula pituitária responde aos eventos agudos traumáticos e muitas mudanças nos níveis hormonais tornam-se aparentes nas primeiras horas ou dias após o trauma.^(61,78) Estudos recentes têm mostrado que vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e radicais livres, podem afetar a função endócrina na fase aguda do TCE.⁽⁷⁸⁾ Essas alterações representam parte da resposta adaptativa aguda ao trauma, e podem também ser influenciadas pelas medicações usadas nesta fase, como glicocorticóides, narcóticos ou agentes dopaminérgicos.⁽⁶¹⁾ As alterações

hormonais da fase aguda após o TCE geralmente não predizem disfunção hipofisária após um ano.⁽⁷⁸⁾ A função hipofisária em pacientes com TCE pode melhorar com o tempo, sugerindo que as insuficiências isoladas ou mesmo múltiplas diagnosticadas a curto prazo sejam transitórias. Por outro lado, uma função pituitária normal a curto prazo pode, embora seja raro, tornar-se diminuída 12 meses após o trauma.⁽⁷⁶⁾

Agha et al.⁽⁷⁹⁾ estudando pacientes vítimas de TCE após admissão na UTI, encontraram 56,5% de disfunção hipofisária na fase aguda do TCE. Estes resultados foram confirmados por Dimopoulou et al.⁽⁸⁰⁾ em estudo realizado em condições similares, que mostrou que 53% dos pacientes demonstravam pelo menos uma deficiência no eixo hormonal, sendo que o hipoadrenalismo e a disfunção gonadal eram as deficiências mais frequentes. Tanriverdi et al.⁽⁷⁸⁾ encontrou uma correlação positiva entre os níveis de testosterona na fase aguda do TCE e o escore da GCS. Neste mesmo estudo, os níveis de GH e IGF-I não se correlacionaram com a gravidade do TCE.

Por outro lado, concentrações séricas elevadas de cortisol estão geralmente presentes durante a fase inicial do trauma e estão associadas com aumento de liberação de ACTH, o qual presumivelmente decorre da ativação de citocinas, do sistema noradrenérgico e do fator de liberação de corticotrofina.⁽⁶¹⁾ Em alguns casos, anormalidades na dinâmica da secreção de cortisol (hipercortisolemia de jejum, abolição do ritmo diurno normal e supressão inadequada após dexametasona) podem persistir por muitos meses após o TCE.⁽⁷⁸⁾ Tanriverdi et al.⁽⁷⁸⁾ em estudo prospectivo onde as dosagens foram feitas nas primeiras 24 horas de internação na UTI e doze meses após, encontraram que os níveis médios de cortisol estavam significativamente aumentados na fase aguda comparativamente com os níveis medidos 12 meses após, e que os níveis de cortisol estavam positivamente correlacionados com os níveis de ACTH, implicando em uma ativação central do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Contudo, não foi encontrada qualquer correlação entre os níveis de cortisol e a gravidade da lesão, embora alguns autores tenham demonstrado correlação entre a GCS e os níveis iniciais de cortisol e entre os níveis de cortisol e o prognóstico. Níveis séricos de globulina ligante ao cortisol podem estar reduzidos em estados catabólicos resultando em níveis de cortisol total desproporcionalmente baixos comparativamente ao cortisol livre (biologicamente ativo).^(77,81)

Hiperprolactinemia está presente em mais de 50% dos pacientes na fase aguda pós-TCE. A demonstração de uma correlação negativa entre as concentrações de prolactina e a gravidade do TCE sugere um bom papel prog-

nóstico para as respostas de prolactina na fase aguda após TCE.^(61,81) Hipopituitarismo posterior também pode estar presente após o TCE, com diabetes insípido central. A prevalência de diabetes insípido após TCE, na fase aguda, chega a 26%.⁽⁷⁷⁾

Estudos experimentais têm demonstrado aumentos do RNAm da leptina no cérebro de ratos nas primeiras horas após o TCE.⁽⁸²⁾ A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos que regula a saciedade e o metabolismo energético pela ativação de receptores expressos no hipotálamo. Evidências recentes indicam que a leptina poderia ser neuroprotetora.⁽⁸³⁾ Níveis elevados de leptina foram encontrados em pacientes masculinos com lesão de medula espinhal.⁽⁸⁴⁾

A aldosterona também já foi estudada como um marcador bioquímico do estágio agudo do TCE.⁽⁸⁵⁾

CONCLUSÃO

A pesquisa de biomarcadores com valor prognóstico no TCE grave representa um campo promissor de progresso no manejo do TCE. Alguns biomarcadores, como a S100B e a NSE, estão em fase de estudos clínicos. Contudo, as evidências tem demonstrado novos biomarcadores promissores, dentre os quais se destacam o DNA plasmático, a HSP70, o fator von Willebrand e o BDNF.

ABSTRACT

Trauma is the leading cause of death of people from 1 to 44 years of age. Traumatic brain injury is the main determinant for mortality and morbidity caused by trauma. Outcome prediction is one of the major problems related to severe traumatic brain injury because clinical evaluation has an unreliable predictive value and complicates identification of patients with higher risk of developing secondary lesions and fatal outcome. That is why, there is considerable interest in development of biomarkers that reflect the severity of brain injury and correlate with mortality and functional outcome. Proteins S100B and neuron specific enolases are among the markers most studied for this purpose, however some studies are investigating glial fibrillary acidic protein, creatinine phosphokinase, isoenzyme B, myelin basic protein, plasma desoxiribonucleic acid, heat shock protein 70, von Willebrand factor, metalloproteinases and brain-derived neurotrophic factor, among others. Evidence suggests that inflammation, oxidative stress, excitotoxicity, neuroendocrine responses and apoptosis play an important role in the development of secondary lesions. Markers involved in these processes are being studied in traumatic brain injury. We reviewed these biomarkers, some of which present promising results for future clinical application.

Keywords: Brain injuries/mortality; Brain injuries/complications; Prognosis; Biological markers/blood

REFERÊNCIAS

1. Bruns J Jr, Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 10:2-10.
2. Kraus JF, MacArthur DL, Silverman TA, Jayaraman M. Epidemiology of brain injury. In: Narayan RK, Wilberger JE Jr, Povlishock JT, editors. *Neurotrauma*. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 13-30.
3. Finfer SR, Cohen J. Severe traumatic brain injury. *Resuscitation*. 2001;48(1):77-90.
4. Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet*. 2000;356(9233):923-9. Review.
5. Balestreri M, Czosnyka M, Chatfield DA, Steiner LA, Schmidt EA, Smielewski P, et al. Predictive value of Glasgow Coma Scale after brain trauma: change in trend over the past ten years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(1):161-2.
6. Stuke L, Diaz-Arrastia R, Gentilello LM, Shafi S. Effect of alcohol on Glasgow Coma Scale in head-injured patients. *Ann Surg*. 2007;245(4):651-5.
7. da Rocha AB, Schneider RF, de Freitas GR, André C, Grievich I, Zanoni C, et al. Role of serum S100B as a predictive marker of fatal outcome following isolated severe head injury or multitrauma in males. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(10):1234-42.
8. Zink BJ. Traumatic brain injury outcome: concepts for emergency care. *Ann Emerg Med*. 2001;37(3):318-32.
9. Gentry LR. Imaging of closed head injury. *Radiology*. 1994;191(1):1-17.
10. Toyama Y, Kobayashi T, Nishiyama Y, Satoh K, Ohkawa M, Seki K. CT for acute stage of closed head injury. *Radiat Med*. 2005;23(5):309-16.
11. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Jane JA, et al. A new classification of head injury based on computerized tomography. *J Neurosurg*. 1991;75 Suppl:S14-20.
12. Maas AI, Hukkelhoven CW, Marshall LF, Steyerberg EW. Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors. *Neurosurgery*. 2005;57(6):1173-82; discussion 1173-82.
13. Doberstein CE, Hovda DA, Becker DP. Clinical considerations in the reduction of secondary brain injury. *Ann*

- Emerg Med. 1993;22(6):993-7.
14. Petzold A, Green AJ, Keir G, Fairley S, Kitchen N, Smith M, Thompson EJ. Role of serum S100B as an early predictor of high intracranial pressure and mortality in brain injury: a pilot study. *Crit Care Med.* 2002;30(12):2705-10.
 15. Raabe A, Grolms C, Sorge O, Zimmermann M, Seifert V. Serum S-100B protein in severe head injury. *Neurosurgery.* 1999;45(3):477-83. Comment in: *Neurosurgery.* 2000;46(4):1026-7. *Neurosurgery.* 2001;49(6):1491-2; author reply 1492-3.
 16. Ingebrigtsen T, Romner B. Biochemical serum markers of traumatic brain injury. *J Trauma.* 2002;52(4):798-808. Review.
 17. Townend WJ, Guy MJ, Pani MA, Martin B, Yates DW. Head injury outcome prediction in the emergency department: a role for protein S-100B? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;73(5):542-6.
 18. Pelinka LE, Kroepfl A, Schmidhammer R, Krenn M, Buchinger W, Redl H, Raabe A. Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma. *J Trauma.* 2004;57(5):1006-12.
 19. Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer KJ, Kroetz M, Mussack T, Kanz KG, et al. Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock.* 2006;25(5):446-53.
 20. Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Wiedemann E, Gippner-Steppert C, Mutschler W, Jochum M. Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2002;30(12):2669-74. Comment in: *Crit Care Med.* 2002;30(12):2778-9. *Crit Care Med.* 2003;31(9):2415-6; author reply 2416-7.
 21. Pelinka LE, Toegel E, Mauritz W, Redl H. Serum S 100 B: a marker of brain damage in traumatic brain injury with and without multiple trauma. *Shock.* 2003;19(3):195-200.
 22. Routsis C, Stamatakis E, Nanas S, Psachoulia C, Stathopoulos A, Koroneos A, et al. Increased levels of serum S100B protein in critically ill patients without brain injury. *Shock.* 2006;26(1):20-4.
 23. Regner A, Kaufman M, Friedman G, Chemale I. Increased serum S100beta protein concentrations following severe head injury in humans: a biochemical marker of brain death? *Neuroreport.* 2001;12(4):691-4.
 24. Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, van Haaren M, Beems T, Zimmerman C, et al. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology.* 2004;62(8):1303-10.
 25. Woertgen C, Rothenberger RD, Metz C, Brawanski A. Comparison of clinical, radiologic, and serum marker as prognostic factors after severe head injury. *J Trauma.* 1999;47(6):1126-30. Erratum in: *J Trauma* 2000;49(3):570-1. Comment in: *J Trauma.* 2000;49(3):570-1.
 26. Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Djilali-Merzoug R, Settergren G. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery.* 2001;48(6):1255-8; discussion 1258-60.
 27. Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemelä O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma.* 2004;56(6):1229-34; discussion 1234.
 28. Pelinka LE, Hertz H, Mauritz W, Harada N, Jafarmadar M, Albrecht M, et al. Nonspecific increase of systemic neuron-specific enolase after trauma: clinical and experimental findings. *Shock.* 2005;24(2):119-23.
 29. Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;70(1):95-100.
 30. Meynaar IA, Oudemans-van Straaten HM, van der Weetering J, Verlooy P, Slaats EH, Bosman RJ, et al. Serum neuron-specific enolase predicts outcome in post-anoxic coma: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2003;29(2):189-95.
 31. Nguyen DN, Spapen H, Su F, Schiettecatte J, Shi L, Hachimi-Idrissi S, Huyghens L. Elevated serum levels of S-100beta protein and neuron-specific enolase are associated with brain injury in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1967-74. Comment in: *Crit Care Med.* 2006;34(7):2022-3.
 32. Schoerhuber W, Kittler H, Sterz F, Behringer W, Holzer M, Frossard M, et al. Time course of serum neuron-specific enolase. A predictor of neurological outcome in patients resuscitated from cardiac arrest. *Stroke.* 1999;30(8):1598-603.
 33. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke.* 2000;31(11):2670-7.
 34. Coplin WM, Longstreth WT Jr, Lam AM, Chandler WL, Mayberg TS, Fine JS, Winn HR. Cerebrospinal fluid creatine kinase-BB isoenzyme activity and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Arch Neurol.* 1999;56(11):1348-52. Comment in: *Arch Neurol.* 1999;56(11):1327-8.
 35. Schwartz JG, Bazan C 3rd, Gage CL, Prihoda TJ, Gilham SL. Serum creatine kinase isoenzyme BB is a

- poor index to the size of various brain lesions. *Clin Chem.* 1989;35(4):651-4. Comment in: *Clin Chem.* 1989;35(9):2018-9. *Clin Chem.* 1990;36(12):2149.
36. Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F, Sutton RL. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. *Neuroscience.* 2008;154(2):530-40.
 37. Saha RN, Liu X, Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1(3):212-22.
 38. Rodrigues E, Oliveira C, Cambrussi A, Gomes G, Godoy D, da Rocha AB, et al. Increased serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) following isolated severe traumatic brain injury in humans. *Brain Inj.* 2008;22(Suppl 1):165.
 39. Berger RP, Dulani T, Adelson D, Leventhal JM, Richichi R, Kochanek PM. Identification of inflicted traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool. *Pediatrics.* 2006;117(2):325-32.
 40. Regner A, Alves LB, Chemale I, Costa MS, Friedman G, Achaval M, et al. Neurochemical characterization of traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma.* 2001;18(8):783-92.
 41. Pineda JA, Wang KK, Hayes RL. Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2004;14(2):202-9.
 42. Pineda JA, Lewis SB, Valadka AB, Papa L, Hannay HJ, Heaton SC, et al. Clinical significance of alphaII-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(2):354-66.
 43. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2004;14(2):215-22.
 44. Satchell MA, Lai Y, Kochanek PM, Wisniewski SR, Fink EL, Siedberg NA, et al. Cytochrome c, a biomarker of apoptosis, is increased in cerebrospinal fluid from infants with inflicted brain injury from child abuse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(7):919-27.
 45. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma.* 2000;17(10):811-29.
 46. Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC, Clark RS. Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB J.* 2003;17(10):1367-9.
 47. Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis.* 2003;8(6):551-62.
 48. Chen J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994;263(5154):1759-62.
 49. Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, et al. Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol.* 2000;10(1):17-29.
 50. Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ.* 2001;8(7):679-86. Comment in: *Cell Death Differ.* 2001;8(7):659-61.
 51. Qiu J, Whalen MJ, Lowenstein P, Fiskum G, Fahy B, Darwish R, et al. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J. Neurosci.* 2002;22(9):3504-11.
 52. Crespo AR, Da Rocha AB, Jotz GP, Schneider RF, Grivicich I, Pinheiro K, et al. Increased serum sFas and TNFalpha following isolated severe head injury in males. *Brain Inj.* 2007;21(4):441-7.
 53. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-75.
 54. Lo YM, Tein MS, Pang CC, Yeung CK, Tong KL, Hjelm NM. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet.* 1998;351(9112):1329-30.
 55. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003;63(14):3966-8.
 56. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem.* 2000;46(3):319-23.
 57. Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, Lo YM. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem.* 2003;49(8):1286-91.
 58. Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, Lo YM. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem.* 2003;49(4):562-9.
 59. 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;24(7):1172-81.
 60. Gopcevic A, Mazul-Sunko B, Marout J, Sekulic A, Antoljak N, Siranovic M, et al. Plasma interleukin-8 as a potential predictor of mortality in adult patients with severe traumatic brain injury. *Tokohu J Exp Med.* 2007;211(4):387-93.
 61. Bondanelli M, Ambrosio MR, Zatelli MC, De Marinis L,

- degli Uberti EC. Hypopituitarism after traumatic brain injury. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(5):679-91. Review.
62. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 2002;35(1):67-86.
 63. Ozdemir D, Uysal N, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Topcu A, et al. Effect of melatonin on brain oxidative damage induced by traumatic brain injury in immature rats. *Physiol Res.* 2005;54(6):631-7.
 64. De Oliveira CO, Martins Dias A, Kespers FAZ, Carvalho FS, Lima M, Xavier M, et al. Superoxide dismutase plasma concentrations following severe traumatic brain injury in humans. *Brain Inj.* 2008;22(Suppl 1):168.
 65. Yokota H, Naoe Y, Nakabayashi M, Unemoto K, Kushi-moto S, Kurokawa A, et al. Cerebral endothelial injury in severe head injury: the significance of measurements of serum thrombomodulin and the von Willebrand factor. *J Neurotrauma.* 2002;19(9):1007-15.
 66. Mendolicchio GL, Ruggeri ZM. New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol.* 2005;42(1):5-14.
 67. Becker S, Schneider W, Kreuz W, Jacobi G, Scharrer I, Nowak-Görtl U. Post-trauma coagulation and fibrinolysis in children suffering from severe cerebro-cranial trauma. *Eur J Pediatr.* 1999;158 Suppl 3:S197-202.
 68. De Oliveira CO, Reimer AG, Da Rocha AB, Grivicich I, Schneider RF, Roisenberg I, et al. Plasma von Willebrand factor levels correlate with clinical outcome of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(8):1331-8.
 69. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000;14(17):2123-33.
 70. Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, Ishihara H, Kajiwara K, Kato S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma.* 2004;21(12):1706-11.
 71. Wang X, Jung J, Asahi M, Chwang W, Russo L, Moskowitz MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J Neurosci.* 2000;20(18):7037-42.
 72. Maier B, Lehnert M, Laurer HL, Marzi I. Biphasic elevation in cerebrospinal fluid and plasma concentrations of endothelin 1 after traumatic brain injury in human patients. *Shock.* 2007;27(6):610-4.
 73. da Rocha AB, Zanoni C, de Freitas GR, André C, Himelfarb S, Schneider RF, et al. Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J Neurotrauma.* 2005;22(9):966-77.
 74. Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackersie RC. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma.* 2002;52(4):611-7; discussion 617.
 75. Acerini CL, Tasker RC, Bellone S, Bona G, Thompson CJ, Savage MO. Hypopituitarism in childhood and adolescence following traumatic brain injury: the case for prospective endocrine investigation. *Eur J Endocrinol.* 2006;155(5):663-9.
 76. Aimaretti G, Ambrosio MR, Di Somma C, Gasperi M, Cannavò S, Scaroni C, et al. Residual pituitary function after brain injury-induced hypopituitarism: a prospective 12-month study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6085-92.
 77. Schneider HJ, Kreitschmann-Andermahr I, Ghigo E, Stalla GK, Agha A. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *JAMA.* 2007;298(12):1429-38.
 78. Tanriverdi F, Senyurek H, Unluhizarci K, Selcuklu A, Casanueva FF, Kelestimur F. High risk of hypopituitarism after traumatic brain injury: a prospective investigation of anterior pituitary function in the acute phase and 12 months after trauma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2105-11.
 79. Agha A, Rogers B, Mylotte D, Taleb F, Tormey W, Phillips J, Thompson CJ. Neuroendocrine dysfunction in the acute phase of traumatic brain injury. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60(5):584-91.
 80. Dimopoulou I, Tsagarakis S, Theodorakapoulou M, Douka E, Zervou M, Kouyialis AT, et al. Endocrine abnormalities in critical care patients with moderate-to-severe head trauma: incidence, pattern and predisposing factors. *Intensive Care Med.* 2004;30(6):1051-7.
 81. De Oliveira CO, Schneider RF, Godoy D, Lima M, Barreto M, Cavalcanti M, et al. Serum cortisol and prolactin levels following severe traumatic brain injury in males. *Brain Inj.* 2008;22(Suppl.1):167-8.
 82. Brown R, Thompson HJ, Imran SA, Ur E, Wilkinson M. Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain. *Neurosci Lett.* 2008;432(1):73-8.
 83. Tang BL. Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):181-5.
 84. Wang YH, Huang TS, Liang HW, Su TC, Chen SY, Wang TD. Fasting serum levels of adiponectin, ghrelin, and leptin in men with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86(10):1964-8. Erratum in: *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88(5):688.
 85. Takahashi H, Sato H, Tsuji Y. Biochemical markers in the acute stage of head injury – aldosterone and CK-BB. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1989;29(3):192-5.