

Rosane de Lima^{1,2}, Daniel Simon^{1,2,3}, Willy Deivson Leandro da Silva^{1,2}, Débora Dreher Nabinger², Andrea Regner^{1,2,3}

Valor prognóstico das concentrações precoces de metaloproteínas -2 e -9 após traumatismo craniocéfálico grave

Prognostic utility of early plasma matrix metalloproteinases -2 and -9 concentrations after severe traumatic brain injury

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil - Canoas (RS), Brasil.
2. Laboratório de Biomarcadores em Trauma, Universidade Luterana do Brasil - Canoas (RS), Brasil.
3. Curso de Medicina, Universidade Luterana do Brasil - Canoas (RS), Brasil.

RESUMO

Objetivo: Determinar se os níveis plasmáticos das metaloproteínas de matriz -2 e -9 tem associação com a mortalidade na unidade de terapia intensiva em pacientes com trauma craniocéfálico grave, independentemente de lesões não cerebrais associadas.

Métodos: Esta coorte prospectiva incluiu 39 pacientes do sexo masculino com trauma craniocéfálico grave (score na escala de coma Glasgow na admissão hospitalar: 3 – 8). Os níveis plasmáticos das metaloproteínas -2 e -9 foram determinados por ELISA no momento da admissão na unidade de terapia intensiva.

Resultados: O trauma craniocéfálico grave apresentou mortalidade de 46% na unidade de terapia intensiva. Concentrações mais elevadas de metaloproteína -9 apresentaram associação com a mortalidade: $147,94 \pm 18,00$ ng/mL para pacientes que sobreviveram e $224,23 \pm 23,86$ ng/mL para os que não sobreviveram (média \pm erro padrão, respectivamente; $p = 0,022$).

Todavia, não houve associação significativa entre os níveis de metaloproteína -2 e a mortalidade na unidade de terapia intensiva: $315,68 \pm 22,90$ ng/mL para o grupo de sobreviventes e $336,55 \pm 24,29$ ng/mL entre os pacientes que não sobreviveram ($p = 0,499$). Além disso, não se observaram associações significativas entre os níveis de metaloproteína -2 ($p = 0,711$) ou metaloproteína -9 ($p = 0,092$) e a presença de lesões não cerebrais associadas.

Conclusão: Em vítimas de traumatismo craniocéfálico grave, níveis elevados de metaloproteína -9 tiveram valor preditivo para o desfecho fatal na unidade de terapia intensiva independentemente da presença de lesões não cerebrais associadas. Por outro lado, no mesmo cenário, os níveis plasmáticos de metaloproteína -2 não apresentaram associação com a mortalidade na unidade de terapia intensiva

Descritores: Traumatismo craniocéfálico; Biomarcadores; Desfecho fatal; Mortalidade; Metaloproteína de matriz-2; Metaloproteína de matriz-9

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 9 de setembro de 2019

Aceito em 23 de março de 2020

Autor correspondente:

Andrea Regner
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde
Universidade Luterana do Brasil
Avenida Farroupilha, 8.001, Prédio 22, 5o andar - Bairro São José
CEP: 92425-900 - Canoas (RS), Brasil
E-mail: regner@uol.com.br

Editor responsável: Felipe Dal-Pizzol

DOI: 10.5935/0103-507X.20200071

INTRODUÇÃO

Mundialmente, o traumatismo craniocéfálico (TCE) é a principal causa de morte e incapacidade em indivíduos jovens.⁽¹⁾ O TCE grave tem sido associado com taxas de mortalidade entre 30% a 50% (cerca de 90% dos óbitos ocorrem dentro das primeiras 48 horas após a lesão) e, frequentemente, causa sequelas permanentes.⁽²⁾ Embora o pronto reconhecimento de tecido cerebral recuperável seja crucial para o manejo de pacientes com TCE grave, a avaliação precoce da gravidade do trauma, nesses pacientes, representa um desafio na terapia intensiva (UTI).^(1,3,4) O neurotrauma causa ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), e, conseqüentemente, pode ocorrer a liberação de biomoléculas para a circulação sistêmica. Esse contexto incita

a investigação de biomarcadores prognósticos que empreguem técnicas de coleta de amostras minimamente invasivas e que possam ser traduzidos para a prática clínica (por exemplo: S100B, enolase neuronal específica, proteína glial fibrilar ácida e DNA plasmático).^(3,5,6) A lesão primária após o TCE grave é provocada por forças mecânicas que causam a deformação do tecido cerebral. Essa lesão primária desencadeia uma segunda onda de eventos (como, excitotoxicidade, estresse oxidativo, crise metabólica, ruptura da BHE, neuroinflamação, isquemia e edema), que ocorrem de segundos a minutos após a lesão cerebral e podem perdurar por dias, meses ou anos.^(1,4,7) O dano cerebral decorrente da progressão da lesão secundária pode resultar no aumento da pressão intracraniana e culminar com morte encefálica, particularmente nas primeiras 72 horas após o trauma.⁽⁷⁾

As metaloproteinases de matriz (MMPs) têm sido implicadas na progressão da lesão neural (isto é, ruptura da BHE, expansão da área de lesão, e edema vasogênico) após o TCE.^(8,9) As MMPs formam uma grande família de endopeptidases dependentes de zinco e estão relacionadas à remodelagem dinâmica da matriz extracelular (MEC). Evidências demonstraram que a remodelagem da MEC após o neurotrauma afeta as respostas de direcionamento neuronal, plasticidade sináptica e respostas regenerativas.^(8,9) As MMPs são enzimas que sofrem regulação estratégica nos níveis de transcrição gênica e de maturação das suas formas precursoras, pró-MMPs. As MMPs interagem com diversos componentes da MEC, e podem ser inibidas por substâncias endógenas.⁽⁹⁾ Demonstrou-se que, após uma lesão, dependendo da região cerebral e da origem celular, neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endoteliais expressam MMPs específicas de formas diversas.^(9,10) As MMPs também podem ser produzidas por leucócitos circulantes, os quais invadem o cérebro durante processos inflamatórios.⁽⁹⁾

Em condições normais de repouso, a expressão de MMPs é muito limitada, e as MMPs não são detectadas ou são em pequenas quantidades em tecidos ou na circulação sistêmica. Contudo, as moléculas que sinalizam a neuroinflamação, característica da lesão cerebral, podem afetar a transcrição gênica das MMPs.⁽⁷⁻⁹⁾ As MMPs são suprarreguladas no TCE e podem degradar componentes cruciais da matriz cerebrovascular, levando à ruptura da BHE e à exacerbação do edema após o TCE.⁽⁹⁾ Diversos estudos, em animais, sugerem que as MMPs -2 e -9 (MMPs induzíveis encontradas na MEC, líquido e sangue)⁽⁹⁾ desempenham papéis importantes na neuroinflamação e na progressão da lesão secundária após o TCE.^(8,11-15) Em modelos de lesão cerebral aguda, demonstrou-se que a

MMP-9 pode ter duplo papel: um papel patológico na ruptura da BHE, morte de células neurais e hemorragia precoce após a lesão; e outro na recuperação, ao mediar a regeneração cerebral e a remodelação neurovascular durante as fases mais tardias de regeneração.^(16,17)

Demonstrou-se, em um modelo de contusão cortical em ratos, que a MMP-9 contribui para a ruptura da BHE e o edema cerebral, e que ambos podem ser atenuados pelo tratamento com o inibidor de MMP, GM6001.⁽¹⁸⁾ Além disto, camundongos *knockout* para MMP-9 apresentaram diminuição significativa de sequelas motoras após o trauma.⁽¹⁹⁾ No TCE, em seres humanos, diversos estudos (avaliando pequenas amostras de pacientes), relatam níveis mais elevados de MMP-2 e/ou MMP-9 no líquido ou sangue de pacientes com TCE.^(8,11,20) Recentemente, estudos com amostras maiores de indivíduos apresentaram controvérsias com relação à associação entre os níveis plasmáticos de MMP-9 e a mortalidade em pacientes com TCE grave. Lorente et al.⁽¹³⁾ não demonstraram qualquer associação dos níveis plasmáticos de MMP-9 com a mortalidade em uma coorte de cem pacientes com TCE. Por outro lado, em concordância com o estudo realizado por Copin et al.,⁽¹²⁾ recentemente demonstramos associação entre os níveis plasmáticos de MMP-9 e a mortalidade na UTI.⁽²¹⁾ Dessa forma, ainda persistem controvérsias em relação ao valor prognóstico dos níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9 precocemente após o TCE grave.

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se os níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9 após TCE grave apresentam associação com o desfecho primário precoce (mortalidade na UTI) em uma coorte de pacientes do sexo masculino (TCE grave isolado ou com politraumatismo). Demonstramos que, enquanto a MMP-2 não apresentou correlação com a mortalidade na UTI, os níveis plasmáticos de MMP-9 podem representar um promissor biomarcador para prever o desfecho fatal após o TCE grave.

MÉTODOS

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Luterana do Brasil (CEP-ULBRA2008-239H). Este estudo avaliou prospectivamente uma coorte de 39 pacientes admitidos nas UTIs de três centros regionais de trauma (Hospital Cristo Redentor, Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre e Hospital de Pronto Socorro Nelson Marchezan de Canoas) por TCE grave (score na escala de coma de *Glasgow* - ECG de 3 a 8 quando da admissão ao hospital). Os pacientes incluídos no estudo não tinham história prévia de doença neurológica ou psiquiátrica. Quando da admissão no pronto-socorro de trauma, os

pacientes foram inicialmente avaliados, ressuscitados (com cristaloides) e, quando necessário, encaminhados para cirurgia de emergência. Apenas os pacientes transferidos para a UTI de trauma dentro de 12 horas após o TCE foram incluídos no estudo. As variáveis de desfecho clínico estudadas incluíram: sobrevivência (alta da UTI), tempo de permanência na UTI e avaliação neurológica (utilizando o escore na ECG na admissão hospitalar e o escore na escala de desfecho de *Glasgow* (EDG) na alta da UTI. Quando da admissão na UTI de trauma, monitoraram-se parâmetros hemodinâmicos e os escores na ECG. Todos os pacientes foram sedados e ventilados mecanicamente e não receberam corticosteroides. Estudos prévios estabeleceram diferenças entre os sexos com relação à fisiopatologia e ao desfecho após lesão neurológica aguda.⁽²²⁾ Observou-se menor suscetibilidade à lesão pós-ischêmica e pós-traumática em mulheres.⁽²²⁾ Assim, para evitar a interferência de possíveis diferenças dependentes do sexo nos desfechos após traumatismo craniano, no presente estudo foram incluídos apenas pacientes do sexo masculino.

Coleta de amostras de sangue e preparação de plasma para determinação dos níveis de MMP-2 e MMP-9

Quando da admissão à UTI, colheu-se sangue venoso periférico em frascos contendo heparina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.000g por 10 minutos, e, então, o plasma foi removido (com cuidado para não agitar o *pellet*) e congelado em alíquotas a -20°C até o ensaio experimental em lotes. As concentrações plasmáticas de MMP-2 e MMP-9 foram determinadas por ELISA (*kits* para MMP-2 e MMP-9 humanos, Invitrogen, California, USA).

Análise estatística

As variáveis contínuas foram comparadas entre os grupos com utilização do teste *t* de *Student* ou do teste não paramétrico *U* de *Mann-Whitney*. As variáveis categóricas foram testadas com utilização do teste do qui-quadrado. As correlações foram analisadas com utilização do método de correlação não paramétrico de *Spearman*, ou pelo método de regressão linear. A extensão em que as concentrações plasmáticas de MMP-9 diferiram entre os indivíduos que sobreviveram ou morreram na UTI após TCE grave foi avaliada com utilização de curvas obtidas por *Receiver Operator Characteristics* (ROC). A curva ROC foi obtida pelo cálculo da sensibilidade e da especificidade para cada valor distinto de dado observado e plotagem de sensibilidade contra 1-(especificidade). A curva ROC foi utilizada para avaliar os valores ideais de *cutoff* avaliados na admissão no estudo para predizer um desfecho

desfavorável. Um ponto de *cutoff* das curvas foi escolhido para obter a melhor combinação de sensibilidade e especificidade para predição de óbito na UTI. Foi realizada análise de regressão logística para eliminar os efeitos de fatores de confusão, e a variável dependente foi o desfecho primário (morto/vivo). As variáveis independentes testadas foram: idade, cuidados pré-hospitalares, lesões associadas, craniotomia, escore na ECG quando da admissão ao hospital, infecções durante a permanência na UTI e níveis plasmáticos de MMP-9. Todos os valores de *p* apresentados são bicaudais, considerando-se os valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Características da população com traumatismo craniocéfálico

Este estudo incluiu 39 pacientes do sexo masculino que sofreram TCE grave. A tabela 1 mostra as características dos pacientes com TCE, estratificados pelo desfecho primário (mortalidade na UTI). O TCE grave apresentou taxa de mortalidade de 46%, e o tempo mediano entre o evento traumático e o óbito foi de 4 dias. A maior parte dos óbitos ocorreu nas 72 horas após a admissão na UTI. A idade mediana dos pacientes foi de 30 anos, e não houve diferença significativa quanto à idade entre os pacientes que sobreviveram (mediana 27 anos) e os que não sobreviveram (mediana 33 anos). A maioria dos pacientes (84%) recebeu cuidados pré-hospitalares. Os pacientes sobreviventes foram admitidos no hospital com escores ECG de $6,35 \pm 1,69$ (média \pm desvio padrão – DP), enquanto os que tiveram desfecho fatal tiveram escores ECG significativamente mais baixos ($4,66 \pm 1,97$; $p = 0,013$). No total, 15 (38,5%) dos pacientes foram submetidos à craniotomia. O tempo de permanência na UTI variou de 1 a 40 dias, com diferença significativa na comparação entre sobreviventes (mediana 17; 4 - 40 dias) e não sobreviventes (mediana 4,0; 1 - 22 dias; $p < 0,001$). Os escores médios na ECG e EDG na alta da UTI foram de $10,47 \pm 4,18$ e $2,95 \pm 1,01$, média \pm desvio padrão, respectivamente. Os principais mecanismos de trauma foram acidentes com veículo automotor (46%), seguidos por violência interpessoal (26%). Vinte e três (59%) dos pacientes tinham lesões associadas (politrauma), entretanto não houve diferença significativa entre politrauma associado e mortalidade na UTI ($p = 0,088$) (Tabela 1).

As características da população com TCE estratificada pelo tipo de TCE grave (TCE isolado ou TCE associado ao politrauma) são apresentadas na tabela 2. Não se

Tabela 1 - População do estudo com traumatismo craniocéfálico, estratificada pelo desfecho primário (mortalidade na unidade de terapia intensiva)

Variáveis	Todos os pacientes (n = 39)	Alta da UTI (n = 21)	Mortalidade na UTI (n = 18)	Valor de p
Idade (anos)	30 (18 - 64)	27 (18 - 62)	33 (21 - 64)	0,146
Cuidados pré-hospitalares	34 (87,2)	20 (95,2)	14 (77,8)	0,050
ECG na admissão ao hospitalar	5,55 ± 1,99	6,35 ± 1,69	4,66 ± 1,97	0,013*
ECG na admissão na UTI	5,46 ± 2,93	6,47 ± 3,35	4,33 ± 1,88	0,050
Pressão arterial sistólica (mmHg)	131 (60 - 190)	134 (74 - 180)	130 (30 - 190)	0,796
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77 (30 - 118)	77 (34 - 108)	80 (30 - 118)	0,410
Tempo até a coleta de amostra de sangue (horas após a admissão hospitalar)	6,4 ± 5,5	7,2 ± 6,2	5,5 ± 4,5	0,376
Mecanismo do trauma				0,508
Acidente com veículo automotor	18 (46,2)	12 (57,1)	6 (33,3)	
Atropelamento	7 (17,9)	3 (14,3)	4 (22,2)	
Queda	4 (10,3)	2 (9,5)	2 (11,1)	
Assalto	10 (25,6)	4 (19,1)	6 (33,3)	
Craniotomia	15 (38,5)	9 (42,9)	6 (33,3)	0,463
Lesões associadas	23 (59,0)	15 (71,4)	9 (50,0)	0,088
Infecção durante a permanência na UTI	26 (66,7)	17 (80,9)	9 (50,0)	0,041*
Tempo para desfecho (dias)	9,5 (1 - 40)	17,0 (4 - 40)	4,0 (1 - 22)	< 0,001*
ECG na alta da UTI		10,47 ± 4,18		
EDG na alta da UTI		2,95 ± 1,01		
MMP-2 plasmática (ng/mL)	325,31 ± 16,53	315,68 ± 22,90	336,55 ± 24,29	0,499
MMP-9 plasmática (ng/mL)	183,15 ± 15,73	147,94 ± 18,00	224,23 ± 23,86	0,002*

UTI - unidade de terapia intensiva; ECG - escala de coma de Glasgow; EDG - escala de desfechos de Glasgow; MMP - metaloproteinase de matriz. *Estatisticamente significante (teste de Mann-Whitney ou teste do Qui quadrado). Resultados expressos por mediana (amplitude), n (%), média ± desvio padrão ou média ± erro padrão médio.

observaram diferenças significativas entre os grupos com relação a: idade, escores ECG tanto na admissão no pronto-socorro quanto na admissão à UTI, pressão arterial na admissão ao hospital, tempo entre o trauma e o desfecho, ou escores ECG na alta da UTI (Tabela 2). Entretanto, observou-se tendência ($p = 0,058$) a menores escores na ECG na alta da UTI nos pacientes que sofreram politrauma associado ao TCE (Tabela 2).

Níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9

Os níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9 foram determinados precocemente após o TCE quando da admissão à UTI (média de $6,4 \pm 5,5$ horas após admissão ao hospital). A concentração plasmática média de MMP-2 nos pacientes com TCE grave foi de $325,31 \pm 16,53$ ng/mL (média ± erro padrão médio - EPM) (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os níveis de MMP-2 entre os grupos de sobreviventes ($315,68 \pm 22,90$ ng/mL) e não sobreviventes ($336,55 \pm 24,29$ ng/mL) ($p = 0,499$) (Tabela 1). Além disso, não houve correlação entre os níveis de MMP-2 e os escores EDG na alta da UTI ($Spearman = -0,172$; $p = 0,309$). Ainda,

com relação ao tipo de lesão, não houve diferença significativa ($p = 0,711$) nos níveis plasmáticos de MMP-2 entre os grupos de pacientes com TCE isolado ($316,59 \pm 25,57$ ng/mL) ou TCE associado com politrauma ($331,38 \pm 22,06$ ng/mL) (média ± EPM) (Tabela 2).

A concentração plasmática média de MMP-9 nos pacientes com TCE grave foi de $183,15 \pm 15,73$ ng/mL (média ± EPM) (Tabela 1). É notável que houve diferença significativa nos níveis de MMP-9 entre os grupos de pacientes sobreviventes ($147,94 \pm 18,00$ ng/mL) e não sobreviventes ($224,23 \pm 23,86$ ng/mL) ($p = 0,002$, teste U de *Mann-Whitney*) (Tabela 1). De fato, houve correlação entre níveis elevados de MMP-9 e mortalidade na UTI ($Spearman = 0,498$; $p = 0,001$). Também houve correlação entre os níveis de MMP-9 e o tempo de permanência na UTI (regressão linear, $p = 0,020$) e os escores EDG na alta da UTI ($Spearman = -0,491$; $p = 0,002$). Por outro lado, não se observou diferença significativa entre os níveis de MMP-9 e o tipo de lesão: $197,89 \pm 24,53$ ng/mL para pacientes com TCE isolado e $172,90 \pm 20,68$ ng/mL para pacientes com politrauma (média ± EPM, $p = 0,092$) (Tabela 2). Mais ainda,

Tabela 2 - Características da população de traumatismo cranioencefálico, estratificada por tipo de traumatismo cranioencefálico (isolado ou associada a politrauma)

Variável	Isolada (n = 16)	Politraumatismo (n = 23)	Valor de p
Idade (anos)	30,5 (18 - 64)	30,0 (18 - 62)	0,819
Cuidados pré-hospitalares	13 (81,2)	21 (91,3)	0,336
ECG na admissão hospitalar	5,12 ± 2,12	5,86 ± 1,88	0,297
ECG na admissão na UTI	5,30 ± 2,21	5,57 ± 3,38	0,839
Pressão arterial sistólica (mmHg)	140 (60 - 184)	127 (74 - 190)	0,300
Pressão arterial diastólica, mmHg	86 (34 - 118)	75 (30 - 113)	0,222
Mecanismo do trauma			0,172
Acidente com veículo automotor	4 (25,0)	14 (60,9)	
Atropelamento	4 (25,0)	3 (13,0)	
Queda	2 (12,5)	2 (8,7)	
Assalto	6 (37,5)	4 (17,39)	
Tempo até a coleta da amostra de sangue (horas após a admissão hospitalar)	5,60 ± 4,70	6,97 ± 6,05	0,222
Craniotomia	6 (37,5)	19 (82,6)	0,832
Infecção durante a permanência na UTI	9 (56,3)	17 (73,9)	0,250
Tempo até o desfecho (dias)	6 (1 - 39)	13 (2 - 40)	0,080
ECG na alta da UTI	13,33 ± 5,04	9,15 ± 3,10	0,058
EDG na alta da UTI	1,94 ± 1,44	2,05 ± 1,12	0,794
MMP-2 plasmática (ng/mL)	316,59 ± 25,57	331,38 ± 22,06	0,711
MMP-9 plasmática (ng/mL)	197,89 ± 24,53	172,90 ± 20,68	0,092

ECG - escala de coma Glasgow; UTI - unidade de terapia intensiva; EDG - escala de desfechos de Glasgow; MMP - metaloproteinase de matriz. Resultados expressos por mediana (amplitude), n (%) média ± desvio padrão ou média ± erro padrão médio.

não houve correlações entre os níveis de MMP-9 e craniotomia (Spearman = -0,160; $p = 0,339$) ou infecção durante a permanência na UTI (Spearman = -0,101; $p = 0,539$). Na análise da curva ROC selecionou-se um ponto de corte que assegurasse a detecção da maior proporção de indivíduos com desfecho fatal com o menor comprometimento da especificidade. Assim, foi escolhido um *cutoff* de 150,1 ng/mL de MMP-9 nas primeiras 12 horas após a admissão hospitalar. A característica diagnóstica deste ponto de corte foi de uma especificidade da concentração plasmática de MMP-9 para prever a mortalidade de 86% e de uma sensibilidade de 72%. A área sob a curva para as concentrações plasmáticas de MMP-9 foi de 0,788 (intervalo de confiança de 95% - IC95% 0,640 - 0,936; $p = 0,002$).

Realizou-se análise de regressão logística para avaliar a influência da variável independente níveis plasmáticos de MMP-9 no desfecho primário de TCE (mortalidade na UTI). Após ajuste quanto a variáveis de confusão, encontramos como variáveis independentemente associadas com o desfecho negativo (óbito) um escore ECG mais baixo na admissão no hospital ($p = 0,049$), infecção durante a permanência na UTI ($p = 0,031$) e níveis plasmáticos de MMP-9 ($p = 0,011$).

DISCUSSÃO

Considerando que o diagnóstico preciso e precoce da deterioração neurológica em casos graves de TCE representa um desafio na prática clínica, estudamos os níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9 em 39 pacientes do sexo masculino quando admitidos na UTI; os níveis das MMPs foram avaliados precocemente após o TCE grave (média de 6,4 horas após a admissão hospitalar). O estudo mostrou uma associação entre níveis plasmáticos mais altos de MMP-9 e a mortalidade na UTI, independentemente da presença de politrauma associado. Em contraste, não houve associação significativa entre os níveis de MMP-2 e o desfecho fatal. Em concordância com a literatura, os pacientes incluídos no nosso estudo eram, em sua maioria, homens jovens vítimas de acidentes de trânsito e violência interpessoal.⁽¹⁾ A taxa de mortalidade na UTI foi de 46%, e escores na ECG mais baixos na admissão no hospital, infecção durante a permanência na UTI e níveis plasmáticos de MMP-9 apresentaram associação independente com o desfecho fatal.

No contexto do TCE, as MMPs estão envolvidas nos mecanismos de progressão das lesões cerebrais agudas,

tipicamente levando a ruptura da BHE, morte celular e edema cerebral.⁽¹⁵⁾ Considera-se também que as MMPs desempenham papéis importantes na proliferação celular, migração (adesão/dispersão), diferenciação, angiogênese, sinaptogênese, apoptose e resposta imunológica.⁽⁹⁾ Além dessas funções, as MMPs agem como citocinas pró-inflamatórias para regular diversos aspectos da neuroinflamação após o TCE.⁽²³⁾ A lesão cerebral ativa a micróglia que, por sua vez, pode liberar MMP-2, MMP-9 e interleucina (IL)-6.⁽²⁴⁾ Nesse sentido, Suehiro et al.⁽²⁵⁾ relataram que a hipotermia pode ser neuroprotetora, por reduzir os aumentos perilesionais da MMP-9 e IL-6. Além do mais, Harkness et al.⁽²⁶⁾ demonstraram que a ativação *in vitro* do endotélio microvascular cerebral com citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) resulta em uma suprarregulação seletiva da expressão de MMP-9. Reforçando essas evidências, cabe destacar que nosso grupo publicou estudos sobre níveis circulantes aumentados de Fas, TNF- α e IL-6 precocemente após o TCE grave.^(27,28) Além disso, Kim et al.⁽²⁹⁾ demonstraram que camundongos *knockout* Hsp70 submetidos a TCE apresentaram um maior tamanho de lesão, pior hemorragia cerebral e maior expressão e ativação de MMPs. Ressaltamos também que, em outro estudo do grupo, demonstramos correlação entre as concentrações séricas de Hsp70 e o desfecho após o TCE grave.⁽³⁰⁾

Em estudos em animais, evidências mostram que MMP-2 e MMP-9 contribuem para a progressão da lesão secundária após o neurotrauma.^(14,15,31,32) Wang et al.⁽¹⁹⁾ demonstraram em um modelo de TCE que, em camundongos *knockout* com uma deficiência de MMP-9, foi observado menor dano morfológico. Mais ainda, observaram que supressão da MMP-9 atenuou o edema cerebral após TCE,⁽³³⁾ enquanto o SB-3CT, um inibidor potente e seletivo de MMP-2 e MMP-9, reduziu a progressão da lesão secundária e melhorou os desfechos neurocomportamentais após o TCE.⁽³⁴⁾ Recentemente, Pijet et al.⁽³⁵⁾ demonstraram a contribuição da MMP-9 para as alterações estruturais e fisiológicas tardias nos circuitos cerebrais após o TCE. Contudo, a evolução temporal e o pico de expressão e ativação de MMP-2 e MMP-9 após lesão cerebral aguda ainda são incertos; uma elevação dos níveis cerebrais pode iniciar já em 10 minutos após o trauma, e persistir por 7 dias.^(15,19)

Com relação ao TCE em seres humanos, Vilalta et al.⁽⁸⁾ observaram níveis elevados de pró-MMP-2 e pró-MMP-9 no plasma e líquido de 20 pacientes, 12 horas após o TCE. Grossetete et al.⁽¹¹⁾ relataram níveis elevados de MMP-9 no líquido de 7 pacientes precocemente após TCE grave. Ainda, Liu et al.⁽³⁶⁾ relataram que a determinação precoce das

concentrações de MMP-9 no líquido de seis pacientes com TCE se correlacionou com o prognóstico. Suehiro et al.⁽²⁵⁾ encontraram níveis elevados de MMP-9 circulante na admissão hospitalar em pacientes com TCE, enquanto Vajtr et al.⁽²⁰⁾ investigaram 18 pacientes e relataram que foram encontrados níveis plasmáticos mais elevados de MMP-9 durante os primeiros 3 dias em pacientes que foram submetidos a neurocirurgia descompressiva após TCE. Mais recentemente, Lorente et al.⁽¹³⁾ investigaram os níveis séricos de MMP-9 na admissão hospitalar em uma coorte de cem pacientes com TCE grave e não demonstraram associação entre os níveis de MMP-9 e a mortalidade em 30 dias. Em contraste, Copin et al.⁽¹²⁾ demonstraram, em uma coorte de 49 pacientes, que as concentrações de MMP-9 tiveram associação com a mortalidade nas primeiras 48 horas após TCE grave. Notavelmente, em 2017, num estudo de coorte de 80 pacientes com TCE grave, também demonstramos que níveis plasmáticos elevados de MMP-9 tiveram valor preditivo para mortalidade de curto prazo, independentemente da presença de lesões extracerebrais.⁽²¹⁾

Em concordância, no presente estudo verificamos que a detecção precoce de níveis plasmáticos elevados de MMP-9 apresentou associação com a mortalidade na UTI. Por outro lado, os níveis plasmáticos de MMP-2 não apresentaram associação com o desfecho fatal. Essa divergência observada no valor prognóstico da MMP-2 e da MMP-9 está de acordo com estudos prévios. Shi et al.⁽³⁷⁾ investigaram as alterações precoces nas concentrações de MMP-2, MMP-9 e do inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP-1) em um modelo de estudo de lesão cerebral em ratos com ossificação heterotópica induzida por trauma e demonstraram que a MMP-9, porém não a MMP-2, contribui para a remodelagem e calcificação da MEC, resultando na indução de células precursoras de osteoblastos na ossificação heterotópica. Em um modelo de lesão focal, Guilfoyle et al.⁽³⁸⁾ relataram que, embora as concentrações de MMP-9 se encontrassem elevadas no tecido pericontusional no cérebro em comparação com o tecido cerebral normal, não se identificou qualquer diferença significativa em relação a MMP-2. Mais ainda, Underly et al.⁽³⁹⁾ demonstraram que a coadministração de somata de pericitos e um inibidor de MMP-9, porém não um inibidor de MMP-2, foram capazes de reduzir o dano à BHE durante isquemia cerebral. Distintos padrões de expressão e ativação de MMP-2 e MMP-9 podem, pelo menos parcialmente, explicar seus diferentes papéis após o TCE.^(8,40)

Portanto, o conjunto dos estudos indica que a suprarregulação, tanto local quanto sistêmica, de MMP-2 e MMP-9, durante a fase aguda após a lesão neural, estão implicadas na fisiopatologia do TCE.^(8,14-19,25,33,40) Por essa

razão, as MMPs representam alvos terapêuticos promissores. De fato, foi demonstrado com metodologia robusta que inibidores farmacológicos das MMPs podem reduzir a formação de edema causado pelo TCE, o comprometimento da BHE, a neuroinflamação e a isquemia cerebral.^(14-19,25,33)

De forma alternativa, é importante considerarmos os potenciais efeitos positivos da MMP-2 e da MMP-9 nos processos de reparo e regeneração após lesões neurais agudas.^(9,36) Nessa perspectiva, Danilina et al.⁽⁴¹⁾ estudaram o potencial neuroprotetor de células estromais mesenquimais multipotentes expostas a pré-condicionamento inflamatório no TCE. As condições de cultura que estimulam a inflamação aumentaram a produção de MMP-2 e MMP-9, porém não reduziram sua efetividade terapêutica. Mais ainda, em algumas variantes de pré-condicionamento inflamatório, as células mesenquimais exibiram propriedades neuroprotetoras mais pronunciadas, reduzindo o volume de lesões cerebrais e promovendo recuperação das funções neurológicas após TCE.⁽⁴¹⁾

Embora tenhamos demonstrado que os níveis plasmáticos de MMP-9 tiveram valor prognóstico para a mortalidade precoce e os escores de EDG após TCE grave, as possíveis limitações deste estudo estão relacionadas ao tamanho limitado da amostra e ao fato de que não

analisamos o potencial valor preditivo de MMP-2 ou MMP-9, considerando desfechos de mortalidade e de sequelas permanentes no longo prazo.

CONCLUSÃO

No presente estudo demonstramos que concentrações plasmáticas mais elevadas de MMP-9, porém não de MMP-2, tiveram valor prognóstico para a mortalidade na unidade de terapia intensiva e para os escores na escala de desfechos de *Glasgow* na alta, em pacientes com traumatismo craniocéfálico grave, independentemente da presença de politrauma associado. Portanto, o potencial translacional da MMP-9, após a lesão cerebral por traumatismo craniocéfálico, é promissor, tanto nas perspectivas diagnósticas quanto terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), bolsa de pesquisa 03/2017 - PPSUS, Processo: 17/2551-0001382-4. Este estudo foi financiado, em parte, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - financiamento código 001.

ABSTRACT

Objective: To determine whether the matrix metalloproteinases-2 and -9 plasma levels were associated with intensive care unit mortality in patients who suffered severe traumatic brain injury, despite the presence of extracerebral injuries.

Methods: This prospective cohort enrolled 39 male patients who suffered severe traumatic brain injury (Glasgow coma scale: 3 - 8 at hospital admission). The plasma matrix metalloproteinase -2 and matrix metalloproteinase -9 levels were determined by ELISA at the time of intensive care unit admission.

Results: Severe traumatic brain injury was associated with a 46% intensive care unit mortality rate. Higher plasma matrix metalloproteinase -9 concentrations were associated with mortality: 147.94 ± 18.00 ng/mL for survivors and 224.23 ± 23.86 ng/mL for nonsurvivors (mean \pm standard error of the mean, $p = 0.022$). In contrast, there was no

significant association between matrix metalloproteinase -2 levels and intensive care unit mortality: 315.68 ± 22.90 ng/mL for survivors and 336.55 ± 24.29 ng/mL for nonsurvivors ($p = 0.499$). Additionally, there were no significant associations between matrix metalloproteinase -2 ($p = 0.711$) and matrix metalloproteinase -9 ($p = 0.092$) levels and the presence of associated lesions.

Conclusion: Increased plasma matrix metalloproteinase -9 levels were associated with intensive care unit mortality following severe traumatic brain injury, regardless of the presence of extracerebral injuries. Conversely, in this same context, plasma matrix metalloproteinase -2 levels were not associated with short-term fatal outcome prediction.

Keywords: Traumatic brain injury; Biomarkers; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9; Fatal outcome; Mortality

REFERÊNCIAS

- Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet*. 2000;356(9233):923-9.
- Coronado VG, Xu L, Basavaraju SV, McGuire LC, Wald MM, Faul MD, Guzman BR, Hemphill JD; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. *MMWR Surveill Summ*. 2011;60(5):1-32.
- 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.
- Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury*. 2007;38(12):1392-400.
- Regner A, Meirelles LD, Ikuta N, Cecchini A, Simon D. Prognostic utility of circulating nucleic acids in acute brain injuries. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(11):925-38.

6. Rodrigues Filho EM, Simon D, Ikuta N, Klován C, Dannebrock FA, Oliveira de Oliveira C, et al. Elevated cell-free plasma DNA level as an independent predictor of mortality in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(19):1639-46.
7. Regner A, Meirelles LS, Simon D. Traumatic penumbra: opportunities for neuroprotective and neurorestorative processes. In: Gorbunov N, editor. *Traumatic brain injury: pathobiology, advanced diagnostics and acute management*. London, UK: IntechOpen; 2018. pp. 49-83.
8. Vilalta A, Sahuquillo J, Rosell A, Poca MA, Riveiro M, Montaner J. Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases. *Intensive Care Med*. 2008;34(8):1384-92.
9. Abdul-Muneer PM, Pfister BJ, Haorah J, Chandra N. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):6106-23.
10. Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*. 2005;50(4):329-39.
11. Grossetete M, Phelps J, Arko L, Yonas H, Rosenberg GA. Elevation of matrix metalloproteinases 3 and 9 in cerebrospinal fluid and blood in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2009;65(4):702-8.
12. Copin JC, Rebetez MM, Turck N, Robin X, Sanchez JC, Schaller K, et al. Matrix metalloproteinase 9 and cellular fibronectin plasma concentrations are predictors of the composite endpoint of length of stay and death in the intensive care unit after severe traumatic brain injury. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012;20:83.
13. Lorente L, Martín MM, López P, Ramos L, Blanquer J, Cáceres JJ, et al. Association between serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels and mortality in patients with severe brain trauma injury. *PLoS One*. 2014;9(4):e94370.
14. del Zoppo GJ, Frankowski H, Gu Y, Osada T, Kanazawa M, Milner R, et al. Microglial cell activation is a source of metalloproteinase generation during hemorrhagic transformation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(5):919-32.
15. Suofu Y, Clark JF, Broderick JP, Kurosawa Y, Wagner KR, Lu A. Matrix metalloproteinase-2 or -9 deletions protect against hemorrhagic transformation during early stage of cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroscience*. 2012;212:180-9.
16. Zhao HD, Zhang YD. The effects of previous statin treatment on plasma matrix metalloproteinase-9 level in Chinese stroke patients undergoing thrombolysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(10):2788-93.
17. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2001;21(19):7724-32.
18. Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;96:130-3.
19. 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.
20. Vajtr D, Benada O, Kukacka J, Prsa R, Houstava L, Toupalik P, et al. Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol Res*. 2009;58(2):263-8.
21. Simon D, Evaldt J, Nabinger DD, Fontana MF, Klein MG, do Amaral Gomes J, et al. A. Plasma matrix metalloproteinase-9 levels predict intensive care unit mortality early after severe traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2017;31(3):390-5.
22. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma*. 2000;17(5):367-88.
23. da Silva Meirelles L, Simon D, Regner A. Neurotrauma: the crosstalk between neurotrophins and inflammation in the acutely injured brain. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):1082.
24. Gottschall PE, Yu X, Bing B. Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res*. 1995;42(3):335-42.
25. 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.
26. Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, Davies-Jones GA, Greenwood J, Woodroffe MN. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain*. 2000;123(Pt 4):698-709.
27. 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.
28. Ferreira LC, Regner A, Miotto KD, Moura SD, Ikuta N, Vargas AE, et al. Increased levels of interleukin-6, -8 and -10 are associated with fatal outcome following severe traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2014;28(10):1311-6.
29. Kim JY, Kim N, Zheng Z, Lee JE, Yenari MA. The 70 kDa heat shock protein protects against experimental traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2013;58:289-95.
30. 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.
31. Alvarez-Sabín J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribó M, et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke*. 2004;35(6):1316-22.
32. Rosell A, Ortega-Aznar A, Varez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006;37(6):1399-406.
33. Mori T, Wang X, Aoki T, Lo HE. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2002;19(11):1411-9.
34. Hadass O, Tomlinson BN, Gooyit M, Chen S, Purdy JJ, Walker JM, et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-9 attenuates secondary damage resulting from severe traumatic brain injury. *PLoS One*. 2013;8(10):e76904.
35. Pijet B, Stefaniuk M, Kostrzewska-Ksiezzyk A, Tsilibary PE, Tzinia A, Kaczmarek L. Elevation of MMP-9 levels promotes epileptogenesis after traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2018;55(12):9294-306.
36. Liu CL, Chen CC, Lee HC, Cho DY. Matrix metalloproteinase-9 in the ventricular cerebrospinal fluid correlated with the prognosis of traumatic brain injury. *Turk Neurosurg*. 2014;24(3):363-8.
37. Shi WZ, Ju JY, Xiao HJ, Xue F, Wu J, Pan MM, et al. Dynamics of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 in a rat model of brain injury combined with traumatic heterotopic ossification. *Mol Med Rep*. 2017;15(4):2129-35.
38. Guilfoyle MR, Carpenter KL, Helmy A, Pickard JD, Menon DK, Hutchinson PJ. Matrix metalloproteinase expression in contusional traumatic brain injury: a paired microdialysis study. *J Neurotrauma*. 2015;32(20):1553-9.
39. Underly RG, Levy M, Hartmann DA, Grant RI, Watson AN, Shih AY. Pericytes as inducers of rapid, matrix metalloproteinase-9-dependent capillary damage during ischemia. *J Neurosci*. 2017;37(1):129-40.
40. Rojas H, Ritter C, Pizzol FD. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(2):222-7.
41. Danilina TI, Silachev DN, Pevzner IB, Gulyaev MV, Pirogov YA, Zorova LD, et al. The influence of proinflammatory factors on the neuroprotective efficiency of multipotent mesenchymal stromal cells in traumatic brain injury. *Bull Exp Biol Med*. 2017;163(4):528-34.