



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

MARIA EMÍLIA RODRIGUES DE OLIVEIRA THAIS

**VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO DESEMPENHO
COGNITIVO TARDIO DE PACIENTES COM TRAUMATISMO
CRÂNIO-ENCEFÁLICO GRAVE**

**FLORIANÓPOLIS
2012**

MARIA EMÍLIA RODRIGUES DE OLIVEIRA THAIS

**VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO DESEMPENHO
COGNITIVO TARDIO DE PACIENTES COM TRAUMATISMO
CRÂNIO-ENCEFÁLICO GRAVE**

Tese de Doutorado apresentado a Banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Profº Dr. Roger Walz

Área de Concentração: Doenças de adulto:
Investigação de aspectos clínicos e
epidemiológicos

**FLORIANÓPOLIS
2012**

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

T364v Thais, Maria Emília Rodrigues de Oliveira
Variáveis associadas ao desempenho cognitivo tardio de
pacientes com traumatismo crânio-encefálico grave [tese] /
Maria Emília Rodrigues de Oliveira Thais ; orientador, Roger
Walz. - Florianópolis, SC, 2012.
113 p.: tabs.

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

Inclui referências

1. Ciências médicas. 2. Lesão cerebral. 3. Cognição. I.
Walz, Roger. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

CDU 61

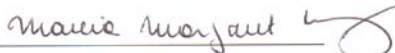
MARIA EMÍLIA RODRIGUES DE OLIVEIRA THAIS

**VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO DESEMPENHO COGNITIVO
TARDIO DE PACIENTES COM TRAUMATISMO CRÂNIO-
ENCEFÁLICO GRAVE**

Esta tese foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

DOUTORA EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 29 de fevereiro de 2012, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Clínica**.



Profa. Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini

Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Roger Walz

Presidente/Orientador


Profa. Dra. Alacoque Lorenzini Erdmann

Membro


Prof. Dr. João Luciano Quevedo

Membro


Profa. Dra. Maria Marlene de Souza Pires

Membro


Profa. Dra. Helena Blasi

Membro


Prof. Dr. Fabricio de Souza Neves

Membro

Florianópolis, 2012

***Dedico esta tese a todos os pacientes
que participaram deste estudo, e ao
meu tio Palmiro que sempre viveu de
maneira especial.***

Agradecimentos

- Ao **Kissao**, marido, companheiro, amigo, pelo carinho, compreensão, e sua paciência, sempre disposto a me ajudar nas situações difíceis. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse chegar até aqui, muito obrigada!!!
- As minhas filhas, **Mayumi e Naomi**, pela compreensão dos momentos de ausência, mas que, com carinho e amor me ajudaram e estiveram do meu lado dando força e apoio.
- Ao **Prof. Roger**, mestre e amigo, pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, enriquecendo meus conhecimentos, contribuindo para meu crescimento profissional. Muito obrigada!
- A minha avó, **Maria Emília**, que aos seus 92 anos de idade sempre me encorajou a prosseguir e a seguir seu exemplo de força e persistência, mesmo diante dos obstáculos.
- Aos meus pais, **Francisco e Marília**, pelo apoio e carinho e pela base que me proporcionaram durante a minha vida.
- A **Maria Joana** que sempre foi uma referência profissional, obrigada pelos ensinamentos.
- Aos colegas de pesquisa, **Alexandre Paim, Gizele, Lucas, Alexandre Hohl, Marcelo Libório, Marcelo Linhares, Carla, Denise, Douglas, Jackson, Fernando**, pelas trocas profissionais e momentos gratificantes. Como é importante trabalhar em grupo!!!
- A todos os colegas, funcionários e professores da pós-graduação em Ciências Médicas pelo convívio e aprendizado.

Resumo:

Objetivos: O trauma cranioencefálico (TCE) é uma das principais causas de mortalidade e morbidade. Há raros estudos prospectivos que investigam a associação de variáveis clínicas e laboratoriais da fase aguda do TCE e o prognóstico cognitivo tardio dos pacientes vítimas de TCE. Este estudo tem como objetivo identificar variáveis clínicas, laboratoriais e biomarcadores de lesão tecidual associados ao prognóstico cognitivo em pacientes vítimas de TCE.

Métodos: Foram coletadas prospectivamente as variáveis da internação hospitalar de 234 pacientes consecutivos com TCE grave (GCS admissão ≤ 8). Dos 172 sobreviventes, uma amostra representada de 46 pacientes realizaram avaliação cognitiva (composta de 15 testes neuropsicológicos) em média 3 ($\pm 1,8$) anos após a hospitalização. Um sub-grupo de 22 pacientes que foram avaliados cognitivamente realizaram análise dos níveis plasmáticos de TBARS (indicativo de dano por estresse oxidativo a lipídeos) e Carbonil (indicador de dano por estresse oxidativo a proteínas) em amostras de sangue coletadas na fase aguda de TCE (mediana de 10, 30 e 70 horas após o impacto do TCE). Um grupo controle (n=23) pareado por sexo, idade e nível socio-educacional foi avaliado cognitivamente para comparação com os pacientes.

Resultados: A média de idade dos pacientes foi 34 (± 13) anos sendo 85% do sexo masculino, com escolaridade média de 9 ($\pm 4,7$) anos. Os pacientes apresentaram um desempenho inferior em todos os testes neuropsicológicos. A análise por regressão linear evidenciou uma forte associação independente (R coeficiente = 0,6 a 0,8) entre maior escolaridade e menor idade e o desempenho cognitivo em 14 dos 15 testes neuropsicológicos avaliados. O desempenho nos testes cognitivos não esteve associado ao gênero, escore de admissão na Escala de Coma de Glasgow (ECG), exame das pupilas, presença de trauma em outros órgãos, e classificação da escala de Marshall na tomografia computadorizada na admissão (TC). Níveis elevados de glicose e presença de hemorragia sub-aracnóide na TC mostraram-se independentemente associados a um menor desempenho no teste de Retenção de Aprendizagem de Rey e de Memória Lógica respectivamente. Embora os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil tenham sido significativamente elevados na fase aguda do TCE, estes biomarcadores não se

mostraram associados ao desempenho cognitivo dos pacientes.

Conclusões: Baixa escolaridade e idade mais avançada são preditores independentes de pior desempenho cognitivo tardio após o TCE grave. O exame de TC e glicemia mostraram limitada capacidade de predição do desempenho cognitivo enquanto que o exame das pupilas, ECG na admissão, presença de trauma associado não foram preditores do desempenho em nenhum dos testes neuropsicológicos avaliados. A medida dos níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil também não se mostrou associada com o desempenho cognitivo dos pacientes. A identificação de variáveis clínicas e laboratoriais associadas ao prognóstico cognitivo após o TCE grave permanece um desafio para a área de neuropsicologia clínica.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Fluxograma de pacientes com TCE grave internados na unidade de terapia intensiva e que realizaram avaliação cognitiva ao menos um ano após a alta hospitalar.....	28
Figura 2: Fluxograma de pacientes com TCE grave internados na unidade de terapia intensiva do Hospital Governador Celso Ramos, que tiveram amostra de sangue coletada durante a internação hospitalar e realizaram avaliação cognitiva ao menos um ano após a alta hospitalar.	33
Figura 3A: Níveis plasmáticos de TBARS medidos em controles e pacientes numa mediana de 11, 30, e 70 horas após o TCE grave..	67
Figura 3B: Níveis plasmáticos de Carbonil medidos em controles e pacientes numa mediana de 11, 30, e 70 horas após o TCE grave.	68
Tabela 1. Variáveis Clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas de pacientes com TCE grave avaliados e não avaliados cognitivamente.	59
Tabela 2. Características e avaliação neuropsicológica de controles e pacientes com TCE grave.....	60
Tabela 3a. Associação entre as variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e neurocirúrgicas, e linguagem e desempenho nos testes WAIS-III nos pacientes de TBI.....	61
Tabela 3b. Associação entre variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas e desempenho nos testes de memória de pacientes com TCE.....	62
Tabela 4. Modelo de regressão logística múltipla linear que melhor explica a associação independente entre o desempenho cognitivo de longo prazo nos testes cognitivos e as variáveis clínicas, demográficas, radiológicas e neurocirurgias dos pacientes sobreviventes de TCE grave.....	63

Tabela 5. Variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas, neurocirúrgicas e marcadores e níveis plasmáticos de estresse oxidativo dos pacientes vítimas de TCE grave.	64
Tabela 6. Características demográficas, sócio-culturais e desempenho cognitivo dos pacientes e controles.....	66
Tabela 7. Correlação entre os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil dos pacientes sobreviventes de TCE grave e o desempenho cognitivo tardio em testes neuropsicológicos.	69

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	13
INTRODUÇÃO	17
1.1 CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO	17
1.2 LESÕES SECUNDÁRIAS, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO	18
1.3 COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS O TCE	20
1.4 MODELOS PROGNÓSTICOS E COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS O TCE	22
2 OBJETIVOS	25
3 MÉTODOS	27
3.1 PARTICIPANTES	27
3.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS, LABORATORIAIS E RADIOLÓGICAS	28
3.3 AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA.....	29
3.4 COLETA DE SANGUE.....	31
3.5 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
3.6 ASPECTOS ÉTICOS:.....	34
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:.....	34
3.7.1 Análise estatística relacionada ao Objetivo Específico 1.....	34
3.7.2 Análise estatística relacionada ao Objetivo Específico 2.....	36
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	71
ANEXO 1.....	73
ANEXO 2.....	94

INTRODUÇÃO

Traumatismo crânio-encefálico (TCE) é a principal causa de morbidade e mortalidade em adultos jovens (1-4). Na Europa são hospitalizados por ano 150-300 pacientes a cada 100.000 habitantes. Acredita-se que estes números sejam ainda maiores em países em desenvolvimento (2).

1.1 CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO

O TCE é uma alteração na função cerebral que se manifesta como confusão, alteração no nível de consciência, convulsão, coma ou déficit neurológico sensitivo ou motor que resulta da aplicação de uma força, penetrante ou não, sobre a cabeça (5).

Pacientes vítimas de TCE podem apresentar distintos tipos de lesões cerebrais. Do ponto de vista morfológico e dos achados da tomografia computadorizada (TC) cerebral, podemos dividir as lesões produzidas pelo TCE em focais e difusas. As lesões focais incluem contusões cerebrais, hematomas intracranianos (epidurais, subdurais e intraparenquimatosos) e alterações cerebrais secundárias a seu efeito expansivo como aumento da pressão intracraniana e distorção do parênquima encefálico (6).

Biomecanicamente, as lesões focais são o resultado do contato direto do crânio com o objeto lesivo e do encéfalo com certas estruturas anatômicas intracranianas e podem ser lesões que em muitos casos requerem tratamento cirúrgico. Já as lesões difusas incluem as alterações axonais e/ou vasculares difusas, as lesões cerebrais por hipóxia e “swelling” cerebral (6).

A escala de avaliação clínica mais utilizada para determinar o nível de consciência de um paciente que sofreu um TCE é a Escala de Coma de Glasgow (ECG). Trata-se de uma escala em que se valorizam três parâmetros independentes: a resposta verbal, a resposta motora e a abertura ocular (7). De acordo com os critérios da Traumatic Coma Data Bank, denomina-se TCE grave todos os casos de pacientes que apresentam uma pontuação na ECG igual ou inferior a 8 (sendo o mínimo de 3) dentro das primeiras 48 horas do acidente e depois de medidas apropriadas de reanimação não cirúrgica (ex.

suporte hemodinâmico) (8). O TCE é considerado moderado quando a pontuação do paciente está compreendida entre 9 a 12. Considera-se TCE leve quando a pontuação é de 13 a 15.

1.2 LESÕES SECUNDÁRIAS, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

As lesões primárias do trauma (contusões, lacerações, hemorragia) podem ser agravadas ainda em nível pré-hospitalar ou após a admissão hospitalar por instabilidade hemodinâmica, hipertensão intracraniana, anemia, infecções, febre, hipóxia, crises epiléticas (convulsivas ou não-convulsivas), desequilíbrios metabólicos e hidro-eletrolíticos. Diferentes mecanismos fisiopatológicos incluindo inflamação, dano mediado por receptores excitatórios, estresse oxidativo e influxo de cálcio se sobrepõem ao dano primário (hematoma, contusões, e dano axonal difuso) na patofisiologia do TCE (9). As lesões primárias podem, portanto induzir a distúrbios secundários bem como cascatas neuroprotetoras, as quais irão interagir com uma complexa rede bioquímica conduzindo a sobrevivência ou não dos neurônios e glias devido à necrose ou a apoptose. (10-13).

O TCE também acarreta respostas inflamatórias através da liberação de diversos mediadores imunes, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, expressão de moléculas de adesão, infiltração celular e fatores de crescimento, podendo resultar em regeneração ou morte celular (14-18). As citocinas são mediadores críticos para neuroinflamação após TCE (16) regulando a ampla variedade de funções celulares através das redes de sinalização autócrinas e parácrinas, que regulam a imunopatologia (17). O TCE está associado ao aumento da síntese e liberação de várias citocinas pro e anti-inflamatórias dentro do sistema nervoso central e corrente sanguínea (19). Nosso grupo de pesquisa recentemente investigou as interleucinas IL-1, IL-6, IL-10 e TNF-alfa como potenciais marcadores do prognóstico de pacientes com TCE (20). Demonstramos que os níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ medidos por citometria de fluxo permanecem indetectáveis 10, 30 e 70 horas mesmo após o TCE grave. Já os níveis séricos de IL-10 e TNF-alfa mostraram-se elevados após o trauma grave em

comparação aos controles. Além disso, a análise por regressão logística múltipla evidenciou que níveis de IL-10 elevados (>90 pg/ml) 10 ou 30 h após TCE foram, respectivamente, 6 (OR 6,2, IC 95% 1,2-25,1, $p = 0,03$) e 5 (OR 5,4, IC 95% 1,2-25,1, $p = 0,03$) vezes mais associados com a mortalidade hospitalar do que os níveis mais baixos (<50 pg/ml), independentemente da idade, escala de Glasgow, avaliação pupilar e achados de tomografia computadorizada na admissão. Estes achados indicam que a modulação dos níveis de IL-10 podem modificar direta ou indiretamente o prognóstico dos pacientes com TCE grave.

Ainda na área de imunologia do TCE, nosso grupo demonstrou que o TCE acarreta um aumento nos níveis séricos de Pentraxina 3, um componente da resposta imune inata (21, 22). A Pentraxina 3 (PTX3) tem sido investigada como um potencial marcador de inflamação, infecção e doença cardiovascular (23). A PTX3 é produzida por várias células e tecidos, em especial macrófagos e células dendríticas em resposta a ativação de receptores do tipo Toll e citocinas inflamatórias. Normalmente a PTX3 não é expressa no SNC, mas sua resposta pode ser altamente induzida por sinais inflamatórios (24) e insulto excitotóxico (25). Nossos resultados foram pioneiros na demonstração de que uma lesão do Sistema Nervoso Central possa modular os níveis séricos de PTX3 em seres humanos. Os pacientes com TCE grave apresentam níveis elevados de PTX3 já nas primeiras 18 horas após o trauma. Níveis de PTX3 acima de 10 $\mu\text{g/ml}$ foram 3 vezes mais associados à mortalidade hospitalar em comparação aos níveis inferiores. Estes resultados mantiveram-se significativos mesmo após o ajuste para idade, exame pupilar, escala de coma de Glasgow, trauma associado e ocorrência de infecção durante a internação (OR ajustado 3.22, CI 95% 1.12 – 10.23, $p = 0.04$), indicando que, assim como a IL-10, a PTX pode estar associada ao prognóstico dos pacientes ou ambas serem marcadores de outra molécula ainda não identificada e que seja a verdadeira responsável pelo prognóstico.

Os mecanismos de estresse oxidativo podem ser ativados por eventos excitotóxicos e inflamatórios diretos, assim como por mecanismos secundários, incluindo reperfusão e redução de ferro resultante de degradação da hemoglobina (reação de Fenton) (26). De fato, o cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu elevado consumo de oxigênio,

níveis mais altos de metais de transição e de ácidos graxos poliinsaturados. Os danos oxidativos contribuem para a disfunção mitocondrial, levando a falência energética e induzindo a uma complexa cascata de eventos celulares, tais como despolarização celular e influxo de Ca^{2+} , levando a excitotoxicidade e a morte neuronal apoptótica. (27). Modelos experimentais de TCE em roedores demonstraram que o dano causado pelo estresse oxidativo pode variar de acordo com as estruturas cerebrais, intensidade do trauma e tempo após a injúria (26). O envolvimento do estresse oxidativo nas lesões cerebrais de pacientes acometidos por TCE tem sido amplamente investigado na literatura, contudo a associação entre seus marcadores no plasma e o prognóstico em humanos permanece controversa (28-31). Nós recentemente demonstramos (32) que o TCE grave está associado ao aumento nos níveis plasmáticos de Carbonil, um marcador de dano oxidativo a proteínas 12, 24 e 70 horas após o TCE. Em 70 horas também observamos um significativo aumento nos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), um marcador de dano oxidativo de lipídios. Neste estudo encontramos uma tendência para um nível plasmático mais elevado de TBARS e Carbonil nas primeiras 10 horas nos pacientes que evoluíram para óbito quando comparado aos sobreviventes. Após a correção para a distribuição de outras variáveis incluindo exame das pupilas, escala de coma de Glasgow, glicemia e escala de Marshall, ficou evidente que a associação entre níveis elevados dos marcadores e a mortalidade era uma associação espúria, provavelmente atribuída a um viés de confusão. O estudo não permitiu estabelecer nenhum tipo de conclusão a respeito do prognóstico de longo prazo dos pacientes, uma vez que o desfecho analisado foi exclusivamente a mortalidade hospitalar. Portanto, os resultados não excluem que os níveis destes biomarcadores possam estar associados às seqüelas nos sobreviventes, incluindo transtornos psiquiátricos e cognitivos.

1.3 COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS O TCE

O trauma craniano é provavelmente a maior causa de

disfunção cognitiva (33) em adultos jovens, tendo um grande impacto social, familiar e pessoal (34). Estas seqüelas são bastante heterogêneas, compreendendo dificuldades cognitivas, de fonação, de audição, transtornos psiquiátricos, comprometimentos motores e sensoriais, epilepsia, entre outras (1, 35). Estudos com pacientes com TCE moderado e grave têm demonstrado comprometimento significativo da cognição em mais de 50% dos pacientes (36, 37). Nos estudos de TCE leve os resultados são mais variados, com alterações cognitivas afetando até 20% dos pacientes (38, 39). O TCE pode afetar vários domínios cognitivos, em particular a atenção, memória de longo prazo e de trabalho, processamento da fala e linguagem, e funções executivas (40). Embora os pacientes tendam a experimentar alguma melhora com o tempo, as deficiências cognitivas freqüentemente têm uma evolução crônica, particularmente após TCE grave, estando presentes muitos anos após o trauma (41, 42). Mais ainda, os transtornos cognitivos têm sido associados a um ajustamento psicossocial prejudicado, bem como problemas de comportamento e emocionais (43, 44).

Apesar de sua importância, os mecanismos determinantes do comprometimento cognitivo do TCE são pouco entendidos. Do ponto de vista neuroanatômico, é razoável considerar que o dano em áreas específicas possa comprometer suas funções com relação à cognição. Por exemplo, lesões na área pré-frontal dorsolateral provavelmente afetam as funções executivas e lesões órbito-frontais, a capacidade de decisão (45). Contudo, estas explicações neuroanatômicas podem ter valor limitado nos casos de TCE, uma vez que freqüentemente ocorrem danos de natureza difusa bem como em outras áreas remotas ao impacto (46). Alguns pacientes podem até mesmo experimentar dificuldades cognitivas na ausência de achados perceptíveis à neuroimagem (47). Como foi mencionado anteriormente, as lesões produzidas pelo trauma (tanto primárias como secundárias) envolvem mecanismos patológicos de isquemia, excitotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo e outros. Estes mecanismos atingem o seu pico na fase inicial após o TCE, nas primeiras 24 horas, e variam de intensidade de acordo com os antecedentes genéticos, características clínicas, intensidade do impacto e condições patológicas concomitantes (9). Contudo, degenerações tardias de substância branca e cinzenta, as quais continuam por anos, também têm sido

descritas com técnicas de imagem modernas (48), juntamente com alterações nas microestruturas do cérebro (46). Esta complexidade de interação entre as características do paciente e do meio tornam o entendimento da repercussão do TCE sobre a cognição um desafio para a neuropsicologia e neurologia modernas.

Embora a caracterização das funções cognitivas após TCE ter sido abordada por vários estudos (40, 42), pouco se conhece com relação ao papel das variáveis clínicas na fase aguda sobre a cognição em períodos mais tardios após TCE. Os estudos são em geral retrospectivos, avaliam pacientes com diferentes gravidades de TCE, de amostras não consecutivas, e sem controle das perdas.

1.4 MODELOS PROGNÓSTICOS E COMPROMETIMENTO COGNITIVO APÓS O TCE

Modelos estatísticos que combinam duas ou mais variáveis de dados dos pacientes para prever os resultados clínicos, também chamados de modelos prognósticos, têm sido aplicados em pesquisas de TCE (2, 49). A identificação de variáveis associadas ao prognóstico pode ajudar na tomada de decisões médicas bem como na identificação de possíveis alvos terapêuticos para os pacientes. Nosso grupo publicou o único estudo Brasileiro prospectivo, e um dos maiores do mundo em termos de número de pacientes incluídos de um único hospital (Hospital Celso Ramos, n = 748), identificando as variáveis associadas ao prognóstico (mortalidade hospitalar) de pacientes com TCE (2). Em consonância a outros estudos internacionais, nós demonstramos que a idade mais avançada, achados mais graves na tomografia computadorizada, pontuação menor na escala de Glasgow, anormalidades no exame da pupila e ausência de trauma de tórax estiveram associadas à maior mortalidade hospitalar dos pacientes com TCE grave. Nosso modelo final de regressão logística evidenciou 76,9% de predição correta, sendo 87,6% para a sobrevivência e apenas 55,6% para o óbito. Os resultados, assim como aqueles observados em outros países, apontam para a necessidade de identificarem-se variáveis adicionais que permitam melhorar a determinação do

prognóstico. Por este motivo, nosso grupo vem se empenhando na busca de biomarcadores que possam auxiliar na determinação do prognóstico dos pacientes. Da mesma forma estes marcadores podem ser importantes na identificação de potenciais alvos terapêuticos.

Outro aspecto importante relacionado aos estudos de prognóstico em TCE é o fato de que virtualmente em todos eles o objetivo é identificar variáveis (clínicas ou biomarcadores) associadas à mortalidade ou deficiências mais grosseiras como, por exemplo, incapacidades motoras. Não há na literatura estudos prospectivos investigando as variáveis demográficas, clínico-cirúrgicas e biomarcadores de fase aguda associadas a um desfecho com avaliação mais minuciosa como o desempenho cognitivo e manifestações psiquiátricas mais tardias após o TCE.

Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar prospectivamente variáveis clínicas, demográficas na fase aguda de amostras consecutivas com pacientes de TCE grave, associadas ao desempenho cognitivo tardio. A complexidade de variáveis envolvidas na patofisiologia do TCE justifica a importância de realizarem-se estudos utilizando uma análise multi-variada por regressão logística para possibilitar a compreensão do impacto independente das variáveis clínico-demográficas, radiológicas e neurocirúrgicas sobre o prognóstico cognitivo a curto e longo prazo do TCE.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Identificar variáveis demográficas, clínicas, neurocirúrgicas, radiológicas e laboratoriais associadas ao desempenho cognitivo em longo prazo de pacientes acometidos por TCE grave.

Objetivos específicos:

1. Identificar variáveis demográficas, clínicas, neurocirúrgicas e radiológicas independentemente associadas ao desempenho cognitivo em longo prazo de pacientes acometidos por TCE grave.

2. Investigar a correlação entre os níveis séricos de biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS e Carbonil) e o desempenho cognitivo em longo prazo de pacientes acometidos por TCE grave.

3 MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES

Entre fevereiro de 2001 e março de 2009 foram admitidos na unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital Governador Celso Ramos (centro de referência em trauma) 234 pacientes com TCE grave e que residiam na região metropolitana de Florianópolis. TCE grave foi definido pela Escala de Coma de Glasgow (ECG) como sendo o escore igual ou inferior a 8 logo após a estabilização do quadro na admissão. Devido ao pequeno número de casos bem como a peculiaridade dos mecanismos envolvidos no TCE, vítimas de arma de fogo não foram incluídas e pacientes com morte cerebral antes de 24 horas de admissão também foram excluídos. Cinquenta e oito pacientes (25.7%) faleceram durante a hospitalização, 3 (1.3%) após a alta hospitalar e 1 (0.4%) permaneceu em estado vegetativo. Dos 172 pacientes que receberam alta com vida e que completariam no mínimo 12 meses entre a data da alta hospitalar e a data da realização da avaliação cognitiva, 118 (68,8%) não foram localizados após extensivos esforços através de telefone, email, telegramas e visitas domiciliares. Oito (4,7%) recusaram-se a participar do estudo. Por fim 46 pacientes (26,7% dos elegíveis) participaram do estudo relacionado ao objetivo específico 1. O fluxograma de inclusão dos mesmos é apresentado na Figura 1.

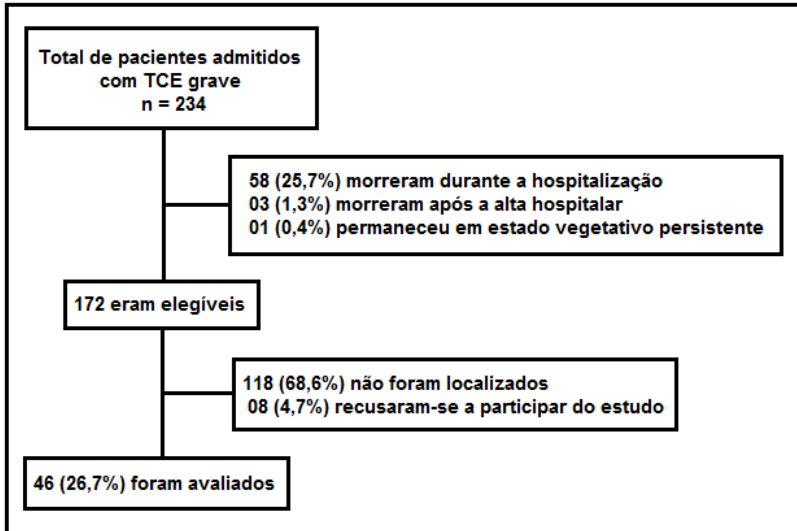


Figura 1: Fluxograma de pacientes com TCE grave internados na unidade de terapia intensiva e que realizaram avaliação cognitiva ao menos um ano após a alta hospitalar.

Um grupo controle de 23 indivíduos acompanhantes de pacientes de outras clínicas, sem história prévia de transtornos psiquiátricos ou neurológicos, pareados por sexo, idade e nível sócio-educacional foi recrutado durante o mesmo período do estudo.

3.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS, LABORATORIAIS E RADIOLÓGICAS

As variáveis coletadas na admissão hospitalar do paciente foram: escala de coma de Glasgow, exame da pupila, achados na tomografia computadorizada (TC), e glicemia. Foi usada a classificação de Marshall (50) para o exame de tomografia computadorizada cerebral da admissão, sendo documentada no mesmo exame a presença de hemorragia subaracnóidea. Variáveis demográficas incluíam sexo, idade no momento do

TCE e da reavaliação após a alta hospitalar, avaliação neuropsicológica (ver adiante), dominância manual, escolaridade (em anos) no momento do TCE. Foi documentada a ocorrência de trauma associado (membros, coluna, tórax ou abdominal). Todos os dados da hospitalização foram coletados prospectivamente.

3.3 AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA

Num período de 3 (\pm 1.8) anos após a hospitalização os pacientes incluídos no estudo foram avaliados cognitivamente por uma psicóloga especializada em neuropsicologia clínica. Avaliação neuropsicológica consiste no método de investigação do funcionamento cognitivo, correlacionando seus resultados com as áreas cerebrais e as funções alteradas. Um protocolo de testes neuropsicológicos específicos foi utilizado para conhecer o perfil cognitivo geral dos pacientes pesquisados, incluindo as funções de memória declarativa episódica para material verbal e visual, funções executivas, memória de trabalho e testes de fluência verbal e não verbal.

Os testes utilizados foram: Fluência categórica e de letras (51), Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT) (52), Wechsler Memory Scale III (WMS-III) sub-testes Logical Memory First Recall (LM 1st), Logical Memory I (LM I), Logical Memory II (LM II), e Visual Reproduction I (VR I), Visual Reproduction II (VR II), Visual Reproduction Recognition (VR Rec), Wechsler Adult Intelligence Scale III (WAIS-III) sub-testes números, semelhanças, vocabulário e cubos, (53). A avaliação neuropsicológica foi realizada de forma cega para todas as variáveis clínicas, radiológicas, neurocirúrgicas e laboratoriais da hospitalização. Abaixo uma descrição dos testes realizados:

Em 2004, NASCIMENTO traduziu e adaptou para o português a escala de inteligência mais utilizada "Weschler Adult Intelligence Scale" (WAIS – III), cuja terceira revisão foi publicada em inglês em 1997. Esta bateria é composta por onze sub-testes, abrangendo exercícios verbais e não verbais (visuo-espaciais), para pessoas com idades entre 16 e 89 anos. Neste estudo foram utilizados 4 subtestes:

Cubos – É avaliada a habilidade de perceber e analisar

formas e o raciocínio para questões visuo-espaciais. É um teste não verbal que requer organização perceptual e visualização espacial.

Vocabulário – Consiste no conhecimento de palavras, incluindo a capacidade de aprendizagem, o acúmulo de informação de conceitos e o desenvolvimento da linguagem.

O Sub-teste semelhanças também foi incluído na testagem, pois avalia os conceitos verbais e a habilidade para integrar objetos e eventos pertencentes ao mesmo grupo em que as respostas podem ser concretas, referindo-se ao que pode ser visto ou tocado; respostas funcionais que são condizentes com a função ou uso dos objetos; e as respostas abstratas com propriedades mais universais ou restritas a uma classificação de um grupo.

Números – É o formato de teste mais comum usado para avaliar a evocação verbal imediata. Tem dois sub-testes, a evocação direta e indireta, envolvendo diferentes atividades mentais e são afetadas diferentemente por danos cerebrais. A repetição de dígitos tende a ser vulnerável ao envolvimento do hemisfério esquerdo, mais do que o direito ou dano difuso. Pacientes com traumatismo crânio-encefálico severo com comprometimento significativo do lobo frontal podem ter dificuldades no aprendizado de seqüências ou perseverar com as séries anteriores. No comprometimento cerebral severo o “span” tende a ser reduzido.

Os exercícios de memória são utilizados para avaliar a memória declarativa episódica para material verbal e visual. Um bom desempenho de memória requer um funcionamento intacto de algumas regiões cerebrais, incluindo as que são especialmente suscetíveis a danos ou doenças.

Para memória verbal foi incluído no protocolo o Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey (RAVLT) para medir a memória recente, a aprendizagem, a susceptibilidade, a retenção, após outras atividades e a memória de reconhecimento. André Rey desenvolveu originalmente este teste, o qual foi modificado por autores para a língua inglesa. Demonstra-se sensível às deficiências de memória encontradas em vários grupos de pacientes, sendo bastante útil para o diagnóstico diferencial nos distúrbios de memória. O RAVLT consiste em uma lista de palavras que são apresentadas oralmente para o paciente e este é solicitado a evocar as

palavras, a lista é repetida 5 vezes.

A escala "Wechsler Memory Scale - WMS" é uma das mais utilizadas em protocolos nacionais e internacionais para a avaliação de memória, em partes ou na versão completa. A WMS já passou por várias revisões, sendo que a última revisão, sem publicação brasileira, contém novos sub-testes, incluindo um exercício de memória com faces. Neste protocolo escolheu-se utilizar os sub-testes de memória lógica e o de reprodução e reconhecimento de figuras da versão WMS-III, publicada em 1997.

Memória Lógica – São lidas duas histórias, e após cada leitura é solicitada a evocação imediata. Trinta minutos após é pedida a evocação tardia das duas histórias. Baixo desempenho é esperado em pacientes com traumatismo crânio-encefálico severo.

Reprodução e Reconhecimento Visual – A reprodução visual é um sub-teste com uma série de desenhos a serem reproduzidos após exposição de 5 a 10 segundos e após trinta minutos. Avalia o comprometimento do hemisfério direito. Para os pacientes com limitação motora foi escolhido acrescentar o reconhecimento visual destes desenhos.

Os testes de "fluência verbal" ou "produção controlada de palavras" fonéticas ou semânticas são indicativos de disfunção de expressão verbal e de funções executivas, as quais apontam para alterações associadas a áreas frontais do hemisfério cerebral dominante. Avalia a produção espontânea de palavras sob condições limitadas.

Fluência Fonética – O examinando deve produzir oralmente quanto mais palavras for possível começando com a mesma letra durante um período de tempo limitado (um minuto).

Fluência Semântica – É solicitado ao examinando que fale o maior número de palavras dentro de uma mesma categoria, como animais.

3.4 COLETA DE SANGUE

Entre abril de 2006 e abril de 2008 incluímos em nosso protocolo de pesquisa além das variáveis já descritas anteriormente, a coleta de amostras de sangue realizadas no

primeiro, segundo e terceiro dia da ocorrência do TCE. Desta forma foi criado um sub-grupo de 79 pacientes que integravam o grupo inicial descrito acima ($n = 234$) dos quais foram disponibilizadas amostras de sangue. As variáveis coletadas na fase aguda bem como a avaliação cognitiva foram as mesmas descritas anteriormente. As amostras de sangue foram utilizadas para a avaliação dos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e sua associação com a mortalidade hospitalar. Os resultados deste estudo foram publicados recentemente por nosso grupo (32). Dos 79 pacientes incluídos, 28 faleceram durante a hospitalização e dos 51 elegíveis, 8 (15,7%) se negaram a participar, 21 (41,2%) não foram localizados. Restaram 22 (43,1%) pacientes que realizaram a avaliação cognitiva, e cujos níveis de marcadores de estresse oxidativo do plasma haviam sido determinados em amostras coletadas na fase aguda do TCE grave. O fluxograma de inclusão destes pacientes é apresentado na Figura 2.

Os níveis de marcadores de estresse oxidativo foram comparados com um grupo controle de 10 indivíduos hígidos, composto de voluntários integrantes da equipe de pesquisadores e técnicos de laboratório pareados por sexo e idade.

3.5 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os parâmetros do estresse oxidativo foram determinados no plasma de amostras de sangue coletadas no primeiro, segundo e terceiro dia após o TCE, conforme descrito previamente por nosso grupo (32).

O período de tempo entre a ocorrência do TCE e a coleta da amostra de sangue foi quantificado por um de nossos pesquisadores. Foram coletadas amostras de 5 mililitros de sangue venoso periférico as quais foram centrifugadas e o plasma armazenado a -20°C , em no máximo 24 horas, e posteriormente a -70°C para análise.

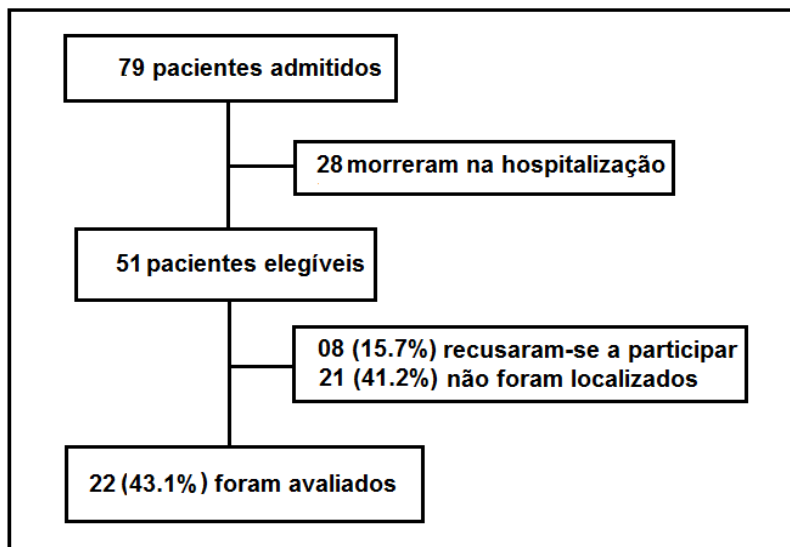


Figura 2: Fluxograma de pacientes com TCE grave internados na unidade de terapia intensiva do Hospital Governador Celso Ramos, que tiveram amostra de sangue coletada durante a internação hospitalar e realizaram avaliação cognitiva ao menos um ano após a alta hospitalar.

Como índice de peroxidação de lipídeos utilizamos a técnica de medida do surgimento de espécies reativas ácido tiobarbitúrico (da sigla em inglês TBARS) cuja metodologia foi descrita previamente em amostras biológicas de modelos experimentais e em plasma humano (26, 32, 54-56). As amostras foram analisadas pela absorbância de 535nm e os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (nm/mg protein). Níveis no plasma de TBARS foram expressos em nmol/mg proteína $\times 10^{-5}$. O dano oxidativo das proteínas foi estimado pela determinação de grupos Carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina conforme descrito previamente (26, 32). As proteínas foram precipitadas, dissolvidas em dinitrofenilidrazina e absorbância foi lida a 370 nm. Níveis de plasma dos grupos carbonil foram expressos em nmol/mg proteína $\times 10^{-14}$. Como existe uma ampla variação nos níveis medidos de TBARS e Carbonil, os resultados foram expressos

em mediana e intervalo interquartil (IQ 25-75). A análise dos parâmetros de estresse oxidativo foi realizada pelos pesquisadores de forma cega para todas as variáveis clínicas, demográficas, neurocirúrgicas, neuroradiológicas e hemodinâmicas dos pacientes.

Os parâmetros clínicos e hemodinâmicos, avaliados no mesmo momento em que foi colhida a amostra foram: pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão positiva expiratória-final (PEEP). As variáveis laboratoriais analisadas na mesma amostra em que foram realizadas as medidas de TBARS e carbonil foram gasometria arterial, sódio, potássio, uréia, creatinina, hematócrito, leucócitos e plaquetas. Estas variáveis foram expressas em média e desvio padrão.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS:

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina e do Hospital Governador Celso Ramos. O consentimento informado foi obtido dos familiares dos pacientes e pelos controles que participaram do estudo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

3.7.1 Análise estatística relacionada ao Objetivo Específico 1

Inicialmente foi analisado se o grupo de pacientes que realizaram a avaliação cognitiva após a alta hospitalar era comparável com os que não foram avaliados, no que diz respeito às variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas coletadas prospectivamente durante a internação. As variáveis categóricas foram analisadas usando Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, variáveis contínuas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U uma vez que havia uma assimetria na distribuição das amostras de pacientes

avaliados e não avaliados cognitivamente.

Uma comparação entre o desempenho cognitivo dos pacientes e o grupo controle (pareado para sexo, idade, escolaridade e dominância manual) foi feita para avaliar quais os domínios da cognição estavam comprometidos nos pacientes sobreviventes de TCE. A variável categórica (dominância manual) foi analisada usando o teste exato de Fisher. As demais variáveis, contínuas, foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U uma vez que havia uma assimetria na distribuição das amostras de pacientes e controles.

A análise univariada foi utilizada para investigar a associação entre o desempenho dos pacientes em cada teste neuropsicológico (variáveis dependentes) e as variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas da hospitalização (variáveis independentes). A distribuição da normalidade das variáveis contínuas foi determinada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. A associação entre os escores nos testes neuropsicológicos e as variáveis independentes contínuas foi investigada através de regressão linear. A associação entre os escores nos testes neuropsicológicos e as variáveis categóricas analisadas pelo teste “t” de student ou ANOVA.

As variáveis independentes que mostraram associação com os escores nos testes neuropsicológicos (variáveis dependentes) na análise univariada com o nível de significância de “p” menor que 0,20 foram incluídas nas análises por regressão linear múltipla. Esta análise permitiu identificar as variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas da fase aguda que estivessem associadas a cada um dos testes cognitivos de forma independente. Nesta análise as variáveis contínuas independentes foram consideradas co-variantes. As variáveis categóricas incluídas no modelo foram classificadas como sendo 0 ou 1 (para as dicotômicas) e 0, 1 ou 2 para aquelas com 3 categoriais. Foram então calculadas a constante, os coeficientes B, R e R^2 do respectivo modelo aplicável a cada teste cognitivo propriamente dito, bem como o coeficiente B de cada variável independente que permaneceu no modelo final de regressão linear. Cada modelo permite avaliar a variação no desempenho dos pacientes em cada um dos diferentes testes neuropsicológicos em função das variáveis obtidas no momento da internação hospitalar. O nível de “p” inferior a 0,05 foi considerado significante, mas

variáveis com níveis de significância até 0,15 foram consideradas relevantes no modelo final caso apresentassem plausibilidade biológica ou clínica.

Nós optamos por não ajustar os níveis significância de “p” devido às múltiplas comparações para valores inferiores a 0,05 para evitar erros do tipo II (57).

3.7.2 Análise estatística relacionada ao Objetivo Específico 2

Inicialmente foi analisado se a amostra de pacientes (n = 22) que realizaram a avaliação cognitiva e tiveram a amostra de sangue coletada e os que não foram avaliados (n = 29) eram comparáveis no que diz respeito às variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais (de rotina e níveis de TBARS e Carbonil), radiológicas e neurocirúrgicas coletadas prospectivamente durante a internação. As variáveis categóricas foram analisadas usando o teste exato de Fisher e as variáveis contínuas (expressas em mediana e intervalo inter quartis 25% e 75%) foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U. Níveis de significância iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Uma comparação entre o desempenho cognitivo dos pacientes e o grupo controle (pareado para sexo, idade, escolaridade e dominância manual) foi feita para avaliar quais os domínios da cognição estavam comprometidos nos pacientes sobreviventes de TCE. A variável categórica (dominância manual) foi analisada usando o teste exato de Fisher. As demais variáveis, contínuas, foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Níveis de significância iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Foram comparados os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil dos pacientes quantificados em uma mediana de 11 horas (n = 22), 30 horas (n = 21) e 70 horas (n = 19) após o trauma com os níveis observados nos controles (n = 10) utilizando-se o teste Mann-Whitney U. A comparação entre os níveis dos marcadores oxidativos nos diferentes tempos após o TCE foi feita pelo teste de Wilcoxon. Níveis de significância iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

A correlação entre os escores de desempenho nos testes cognitivos e os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil medidos na primeira, segunda e terceira amostras de sangue coletadas após o TCE grave foi determinado através do teste de Spearman. Quando identificada uma correlação significativa entre algum dos testes cognitivos e os níveis de marcadores de estresse oxidativo (em diferentes tempos após o TCE), uma regressão linear multivariada foi realizada incluindo o marcador de estresse oxidativo, idade e nível de escolaridade. Níveis de significância iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

As análises foram realizadas com auxílio do software SPSS 17.0.

4 RESULTADOS

A média de idade dos pacientes foi de 34 (DP \pm 13) anos sendo 85% do sexo masculino. Dentre os pacientes avaliados as causas de TCE foram: atropelamento em 5 (10.9%), colisão com automóvel em 9 (19.6%), queda em 13 (28.3%), acidente com motocicleta em 16 (34%), e violência em 3 (6.5%). As variáveis demográficas, clínicas, radiológicas, laboratoriais e neurocirúrgicas investigadas apresentaram uma distribuição normal (Kolmogorok-Smirnov, $p \geq 0.10$).

A Tabela 1 demonstra que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.15$) entre os pacientes avaliados e não avaliados (perdas) para o desempenho cognitivo em relação às variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas. Estes resultados indicaram que o grupo de pacientes avaliados é uma amostra representativa da amostra inicial de sobreviventes de TCE grave e que receberam alta hospitalar no mínimo 1 ano antes da reavaliação.

A tabela 2 mostra as características demográficas e desempenho cognitivo dos pacientes vítimas de TCE e o grupo controle. Não houve diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0.49$) entre os pacientes e o grupo controle em relação à idade, sexo, nível educacional e dominância manual. Pacientes de TCE mostraram um menor desempenho que os controles na fluência de letras e categorias, lista de aprendizagem de palavras de Rey (total, retenção e tardia), memória lógica (primeira evocação, evocações imediata e tardia), reprodução visual (imediata, tardia e reconhecimento) e cubos. Os pacientes também mostraram uma tendência ($p = 0.06$) para desempenho inferior nos subtestes de números, semelhanças e vocabulário do WAIS-III.

Não houve associação entre sexo ($p > 0.24$), ocorrência de trauma em outros órgãos ($p > 0.22$), tempo (em meses) entre a data do TCE e a data da avaliação cognitiva ($p > 0.25$) e os testes avaliados em pacientes de TCE (dados não apresentados). As análises univariadas que evidenciaram a associação entre variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas e o desempenho nos testes cognitivos com nível de significância de “p” igual ou inferior a 0.20 ou menor são apresentados nas tabelas 3a e 3b.

A tabela 4 apresenta o modelo final de regressão linear múltipla que melhor explica as variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas independentemente associadas com o desempenho dos pacientes nos diferentes testes cognitivos. O nível de escolaridade (em anos) mostrou-se independentemente associado a um melhor desempenho em todos os testes cognitivos estudados, exceto para ML II (memória lógica) e RP Rec (reprodução visual reconhecimento). A análise evidenciou que o aumento na idade esteve independentemente associado a um prejuízo nos testes de vocabulário ($p = 0.31$). Níveis iguais ou superiores a 150 mg/dl de glicemia na admissão mostraram-se independentemente associados a um desempenho prejudicado no teste de retenção de RAVLT. Ausência de hemorragia subaracnóidea na TC da admissão esteve independentemente associada a um melhor desempenho no teste de ML II. Ainda em relação à TC, uma classificação de Marshall tipo IV ou mais grave mostrou uma tendência não significativa para uma associação com prejuízo nos testes de vocabulário ($p = 0.08$) e de 1ª evocação da LM ($p = 0.10$).

Dos 51 pacientes cujas amostras de sangue foram coletadas durante a internação hospitalar por TCE grave, 22 realizaram avaliação cognitiva após a alta hospitalar. Conforme apresentado na tabela 5, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes avaliados ($n = 22$) e não avaliados ($n = 29$) em relação às variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas, neurocirúrgicas e níveis de marcadores de estresse oxidativo. A média de idade foi 33.5 (± 14) anos sendo 88.2% do sexo masculinos.

As características demográficas e o desempenho cognitivo dos pacientes ($n = 22$) e controles ($n = 23$) são apresentados na tabela 6. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles no que diz respeito ao sexo, idade, educação e dominância manual quando comparamos os pacientes e controles ($p \geq 0.35$). Entretanto, os pacientes apresentaram um desempenho inferior ao dos controles nos testes de Fluência de Letras e Categorias, RAVLT (total, retenção e tardia), Memória Lógica (primeira evocação, imediata e tardia), Reprodução visual (imediata e tardia) e nos testes de vocabulário e cubos do WAIS-III. Os pacientes também apresentaram uma tendência para um desempenho inferior ao dos controles nos testes de "spam" de dígitos (0,08) e

semelhanças ($p = 0,06$). O desempenho dos pacientes no teste de reconhecimento visual da Reprodução Visual foi semelhante ao observado no grupo controle.

Nas Figuras 3A e 3B são comparados os níveis plasmáticos de TBARS (3A) e Carbonil (3B) analisados na primeira (mediana de 11 horas), segunda (mediana de 30 horas) e terceira (mediana de 70 horas) amostra de sangue coletada após o TCE grave nos pacientes e o grupo controle. Houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos dos pacientes quando comparados aos controles. A análise também evidenciou que houve um aumento progressivo nos níveis plasmáticos de TBARS dos pacientes com o decorrer do tempo após o TCE grave. Quando comparados aos controles, os níveis plasmáticos de Carbonil foram significativamente mais elevados 30 e 70 horas após o TCE grave. Este aumento não foi observado nas amostras coletadas 11 horas após o TCE. A análise também evidenciou que houve um aumento progressivo nos níveis plasmáticos de Carbonil dos pacientes com o decorrer do tempo após TCE grave.

Na tabela 7 são apresentadas as correlações entre os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil avaliados nos diferentes tempos (mediana de 11, 30, e 70 horas) após o TCE grave e o desempenho em cada um dos testes cognitivos aplicados na fase crônica após a alta hospitalar. A única correlação estatisticamente significativa observada dentre todas as análises realizadas foi entre os níveis plasmáticos de TBARS e o desempenho no teste de vocabulário (coeficiente de Spearman 0,50 e $p = 0,04$). Como o desempenho no teste de vocabulário, o nível de escolaridade e a idade apresentaram uma distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov), foi possível realizar uma regressão linear múltipla para avaliar o papel independente do marcador de estresse oxidativo (nível plasmático de TBARS na terceira amostra) sobre o desempenho no teste de vocabulário. Para esta análise optamos por incluir além do marcador TBARS, as variáveis escolaridade (em anos) e classificação de Marshall (categorizada conforme a tabela IV) uma vez que estas se mostraram associadas ao desempenho no vocabulário. A correlação positiva não foi confirmada ($p = 0,23$) após o ajuste para escolaridade e Classificação de Marshall através de uma regressão linear múltipla.

5 DISCUSSÃO

Este é um dos poucos estudos com desenho prospectivo que investigaram a associação entre o desempenho cognitivo tardio de pacientes adultos sobreviventes de TCE grave controlando para variáveis demográficas, clínicas, de neuroimagem, neurocirúrgicas e laboratoriais, e descrição detalhada das perdas ocorridas ao longo do seguimento. Entre todas as variáveis clínicas, demográficas, neurocirúrgicas, laboratoriais e radiológicas da hospitalização investigadas, observou-se uma associação significativa entre baixo nível de educação e idade mais avançada e o pior desempenho cognitivo. Estes achados são concordantes com outros estudos retrospectivos prévios realizados em pacientes comprometidos de TCE em outras populações (46, 58, 59). Os modelos de regressão logística apresentados que incluíram nível educacional e idade (para 9 testes cognitivos) ou uma combinação de uma destas com outra variável (para 6 testes cognitivos) mostraram uma associação de moderada a forte (Coeficiente R = 0.60 a 0.80) entre estas variáveis preditoras e o desempenho cognitivo em 14 testes neuropsicológicos. Os modelos de regressão foram capazes de explicar 41 a 61% dos escores de desempenho dos 14 testes cognitivos, demonstrando que outras variáveis não identificadas devem contribuir significativamente para explicar o desempenho dos testes cognitivos. Também deve ser salientado que, quando comparado com outras amostras de pacientes com TCE (60, 61), nossa amostra é formada por sujeitos particularmente jovens (chegando a ser até 20 anos mais jovens do que em outros estudos), embora hajam estudos em populações com idade média de 34 anos, semelhante ao estudo atual (46). Nossos achados também demonstraram que nessa amostra de pacientes (avaliados em média 3 ± 1.8 anos após TCE), o tempo decorrido após o trauma não permaneceu nos modelos de regressão logística múltipla como uma variável independente associada aos testes cognitivos avaliados.

O baixo nível de associação entre variáveis já bem estabelecidas como sendo marcadores de mortalidade e morbidade como a escala de coma de Glasgow, o exame das pupilas na admissão, glicemia na admissão, Classificação de

Marshall na CT de admissão (2, 32, 62, 63) e o desempenho cognitivo tardio foi uma surpresa para os investigadores. Estes resultados podem indicar que em nossa amostra os mecanismos envolvidos com mortalidade e morbidade diferem, ao menos em parte, daqueles envolvidos com o comprometimento e recuperação das capacidades cognitivas avaliadas tardiamente após o TCE grave. Considerando o limitado tamanho de nossa amostra não é possível excluirmos a possibilidade de ocorrência de erro do tipo II, porque o tamanho da amostra está no limite para a inclusão de 3 a 4 variáveis na análise por regressão múltipla. Entretanto esta possibilidade é menos provável considerando que o nível de significância de “p” para a associação entre estas variáveis e quase todos os testes cognitivos analisados foram superiores a 0.5 quando as variáveis foram individualmente incluídas no modelo de regressão juntamente com idade e nível educacional (dados não apresentados).

A perda de seguimento dos pacientes após a alta hospitalar é reconhecidamente uma limitação mundial (64, 65) para estudos que pretendem estabelecer um grau de associação entre variáveis da internação hospitalar e o prognóstico. Uma variável clínica potencialmente importante da fase aguda e que não foi avaliada neste estudo foi a duração da amnésia pós-traumática (APT). A APT tem sido associada como uma importante variável preditiva do desempenho cognitivo após um ano (66).

Outro aspecto importante é o fato de que um número substancial de variáveis após a hospitalização não é adequadamente controladas e obviamente podem contribuir para o prognóstico cognitivo, incluindo: realização ou não de reabilitação bem como o tipo de abordagem utilizada, seguimento clínico e psicológico, adaptações na moradia para as limitações e recebimento de auxílio doença são alguns dos exemplos a serem citados.

Entretanto, como o desfecho investigado em nosso estudo foi primariamente a existência ou não de associação independente das variáveis acessadas prospectivamente durante a hospitalização e o desempenho cognitivo nos diferentes testes neuropsicológicos, acreditamos que mesmo que variações na distribuição das variáveis do período após a alta (não controladas) não seriam por si só capazes de modificar o efeito

de variáveis da hospitalização que se mostrassem fortemente associadas ao desfecho cognitivo. Em outras palavras, embora as variáveis da hospitalização possam não explicar por completo o desempenho cognitivo tardio dos pacientes sobreviventes, aquelas que se mostrassem fortemente associadas na análise que realizamos provavelmente permaneceriam no modelo de regressão que incluísse variáveis adicionais do período após a alta hospitalar. Portanto, nível muito baixo de associação observado entre as variáveis de hospitalização e o desempenho cognitivo torna improvável que aquelas variáveis possam tornar-se significativamente associadas com o desfecho após controlar o desequilíbrio de qualquer outra variável não-investigada, incluindo a APT.

Embora o comprometimento cognitivo tenha sido associado ao tempo decorrente do TCE em seguimentos de longo prazo como, por exemplo, 5 – 22 anos, (67) ou mesmo acima de 30 anos após o TCE (68), o comprometimento cognitivo observado em nossos pacientes não mostrou uma associação entre o tempo decorrente entre a ocorrência do TCE e a avaliação cognitiva no período de 1 a 6 anos após o trauma. Este seguimento relativamente menos longo dos pacientes de nosso estudo e conseqüentemente idade menos avançada no momento das avaliações cognitivas realizada em nossos pacientes pode ser um dos motivos da não concordância com os resultados do estudo de Senathi-Raja et al. (67) que envolveu pacientes mais velhos.

Nossos resultados evidenciaram que o nível de educação mais elevado e a idade menos avançada estiveram mais predominantemente associados ao melhor desempenho cognitivo tardio após o trauma em nossa amostra de pacientes. Por outro lado, variáveis comumente associadas com mortalidade e morbidade como a Escala de Coma de Glasgow, o exame das pupilas, Classificação de Marshall da TC, escala de coma de Glasgow e níveis da glicemia não tiveram um valor preditivo para o desempenho cognitivo de pacientes sobreviventes com TCE grave limitado.

A identificação de marcadores clínicos e laboratoriais de incapacidade cognitivas tardias em pacientes com TCE grave constitui um importante desafio para a comunidade científica. Este tipo de abordagem é fundamental para desenvolvimento de estratégias de tratamento apropriadas em pacientes com TCE

grave (33, 69, 70). Por este motivo, decidimos investigar a associação entre níveis de marcadores de estresse oxidativo medidos em pacientes na fase aguda do TCE e o respectivo desempenho cognitivo deste grupo de pacientes.

Em modelo experimental, nosso grupo demonstrou que os níveis de TBARS e Carbonil aumentam no cérebro num padrão variável ao longo do tempo e nas diferentes regiões cerebrais dos roedores submetidos ao TCE experimental (26, 71). De fato, o cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo por causa das taxas mais altas de consumo de oxigênio, níveis mais altos de metais de transição, e ácidos graxos poliinsaturados. Os mecanismos de estresse oxidativo podem ser ativados pelos mecanismos excitatórios, assim como vários mecanismos secundários, incluindo reperfusão e ferro na sua forma reduzida resultante de degradação hemoglobina (reação de Fenton) (26). Os danos oxidativos contribuem para a disfunção mitocondrial, levando a falha de energia. Isto poderia desencadear uma cascata complexa de eventos celulares, tais como despolarização celular e influxo de Ca^{2+} levando a excitotoxicidade e a morte neuronal apoptótica. (27). O aumento dos níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil pode também ser relacionado com os danos de estresse oxidativo ocorrendo em outros sistemas orgânicos dos pacientes com TCE grave, como fígado, trato intestinal, pulmão, músculos, associados com trauma múltiplos, além de infecções, e hipóxia.

Já é bem conhecido que a vulnerabilidade do tecido cerebral é variável de acordo com o tipo de lesão e também varia de acordo com as diferentes regiões cerebrais e suas sub-regiões. Por exemplo, a tolerância da substância branca à isquemia é consideravelmente maior que a do neocórtex e este por sua vez mais resistente que o hipocampo. Já considerando o hipocampo, a sub-região CA2 é consideravelmente mais resistente à isquemia que a sub-região CA1. Estas peculiaridades podem justificar em parte, a variabilidade observada no grau de comprometimento dos diferentes domínios da cognição em pacientes com TCE. Por este motivo, uma avaliação de prognóstico cognitivo medido exclusivamente através de uma escala mais grosseira como a de recuperação de Glasgow pode não ser sensível o suficiente para detectar anormalidades mais sutis. Por este motivo optamos por utilizar uma avaliação neuropsicológica mais completa com diferentes testes que

permitam avaliar os vários domínios da função cognitiva.

Nossos achados indicam que os pacientes com TCE têm níveis plasmáticos aumentados de marcadores de estresse oxidativo nos primeiros três dias após o trauma. Entretanto, ao contrário do esperado, estes níveis não foram associados ao prognóstico cognitivo. De fato, a literatura tem demonstrado que aminoácidos excitatórios, sabidamente envolvidos com os mecanismos de dano neuronal devido à excitotoxicidade, também desencadeiam sinais neuroprotetores contra estresse oxidativo. (72). Assim, caso vias neuroprotetoras sejam ativadas numa mesma proporção que as de lesão por estresse oxidativo estaríamos diante de mecanismos compensatórios que justificariam a não associação entre níveis maiores de estresse oxidativo (e conseqüentemente neuroproteção associada) e pior desempenho cognitivo.

CONCLUSÕES

Pacientes vítimas de TCE grave apresentam um comprometimento significativo de longo prazo em vários domínios do funcionamento cognitivo.

A idade mais avançada e menores níveis de escolaridade estão independentemente associados a um pior prognóstico cognitivo de longo prazo após o TCE grave. Este comprometimento é praticamente global, não ocorrendo apenas em domínios específicos da cognição.

Pacientes com TCE grave apresentam níveis elevados de TBARS e Carbonil ao menos três dias após a ocorrência do trauma. Entretanto, os níveis destes marcadores não estão associados com o desempenho cognitivo tardio destes pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Schwarzbald M, Diaz A, Martins ET, Rufino A, Amante LN, Thais ME, et al. Psychiatric disorders and traumatic brain injury. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Aug;4(4):797-816.
2. Martins ET, Linhares MN, Sousa DS, Schroeder HK, Meinerz J, Rigo LA, et al. Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City. *J Trauma*. 2009 Jul;67(1):85-90.
3. Marshall LF, Becker DP, Bowers SA, Cayard C, Eisenberg H, Gross CR, et al. The National Traumatic Coma Data Bank. Part 1: Design, purpose, goals, and results. *J Neurosurg*. 1983 Aug;59(2):276-84.
4. Marshall LF, Toole BM, Bowers SA. The National Traumatic Coma Data Bank. Part 2: Patients who talk and deteriorate: implications for treatment. *J Neurosurg*. 1983 Aug;59(2):285-8.
5. Bruns J, Jr., Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 10:2-10.
6. Graham DI, Adams JH, Gennarelli TA. Pathology of brain damage in head injury. In: Cooper PR, editor. *Head injury*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993. p. 91-113.
7. Jennett B, Snoek J, Bond MR, Brooks N. Disability after severe head injury: observations on the use of the Glasgow Outcome Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1981 Apr;44(4):285-93.
8. Foulkes MA, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Marshall LF. The Traumatic Coma Data Bank: design, methods, and baseline characteristics. *J Neurosurg*. 1991;75(1s):s8-13.
9. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. 2008 Aug;7(8):728-41.
10. LaPlaca MC, Simon CM, Prado GR, Cullen DK. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res*.

2007;161:13-26.

11. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 2003 Apr 3;348(14):1365-75.
12. Spaethling JM, Geddes-Klein DM, Miller WJ, von Reyn CR, Singh P, Mesfin M, et al. Linking impact to cellular and molecular sequelae of CNS injury: modeling in vivo complexity with in vitro simplicity. *Prog Brain Res.* 2007;161:27-39.
13. Graham DP, Cardon AL. An update on substance use and treatment following traumatic brain injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1141:148-62.
14. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury.* 2007 Dec;38(12):1392-400.
15. Stein SC, Smith DH. Coagulopathy in traumatic brain injury. *Neurocrit Care.* 2004;1(4):479-88.
16. Kadhim HJ, Duchateau J, Sebire G. Cytokines and brain injury: invited review. *J Intensive Care Med.* 2008 Jul-Aug;23(4):236-49.
17. Soriano SG, Piva S. Central nervous system inflammation. *Eur J Anaesthesiol Suppl.* 2008;42:154-9.
18. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia.* 2010 Feb;58(3):253-63.
19. Lu J, Goh SJ, Tng PY, Deng YY, Ling EA, Moochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci.* 2009;14:3795-813.
20. Soares FMS, Souza NM, Schwarzbald M, Diaz AP, Nunes JC, Hohl A, et al. Interleukin-10 is an independent biomarker of traumatic brain injury prognosis. submitted. 2011.
21. Brugger-Andersen T, Ponitz V, Kontny F, Staines H, Grundt H, Sagara M, et al. The long pentraxin 3 (PTX3): a novel prognostic inflammatory marker for mortality in acute chest pain. *Thromb Haemost.* 2009 Sep;102(3):555-63.
22. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An

integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28:157-83.

23. Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH, Tracy RP, Psaty BM. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease and all-cause death: the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Apr;29(4):594-9.

24. Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, Blasi E, Agnello D, Ghezzi P, et al. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000 Jul 1;106(1-2):87-94.

25. Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E, et al. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2001;105(1):43-53.

26. Petronilho F, Feier G, de Souza B, Guglielmi C, Constantino LS, Walz R, et al. Oxidative stress in brain according to traumatic brain injury intensity. *J Surg Res.* 2010 Dec;164(2):316-20.

27. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):215-22.

28. Nayak C, Nayak D, Bhat S, Raja A, Rao A. Relationship between neurological outcome and early oxidative changes in erythrocytes in head injury patients. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(5):629-33.

29. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. Time-relative changes in the erythrocyte antioxidant enzyme activities and their relationship with Glasgow Coma Scale scores in severe head injury patients in the 21-day posttraumatic study period. *Indian J Med Sci.* 2007 Jul;61(7):381-9.

30. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. Erythrocyte indicators of oxidative changes in patients with graded traumatic head injury. *Neurol India.* 2008 Jan-Mar;56(1):31-5.

31. Scholpp J, Schubert JK, Miekisch W, Noeldge-Schomburg GF. Lipid peroxidation early after brain injury. *J Neurotrauma.* 2004 Jun;21(6):667-77.

32. Hohl A, Gullo JD, Silva CC, Bertotti MM, Felisberto F, Nunes JC, et al. Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: A multivariate analysis. *J Crit Care*. 2011 Jul 30.
33. Markowitsch HJS, A. Amnesia. *Lancet*. In press.
34. Marsh NV, Kersel DA. Frequency of behavioural problems at one year following traumatic brain injury: correspondence between patient and caregiver reports. *Neuropsychol Rehabil*. 2006 Dec;16(6):684-94.
35. Ietswaart M, Milders M, Crawford JR, Currie D, Scott CL. Longitudinal aspects of emotion recognition in patients with traumatic brain injury. *Neuropsychologia*. 2008 Jan 15;46(1):148-59.
36. Kersel DA, Marsh NV, Havill JH, Sleigh JW. Neuropsychological functioning during the year following severe traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2001 Apr;15(4):283-96.
37. Vakil E. The effect of moderate to severe traumatic brain injury (TBI) on different aspects of memory: a selective review. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2005 Nov;27(8):977-1021.
38. Carroll LJ, Cassidy JD, Peloso PM, Borg J, von Holst H, Holm L, et al. Prognosis for mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *J Rehabil Med*. 2004 Feb(43 Suppl):84-105.
39. Arciniegas DB, Anderson CA, Topkoff J, McAllister TW. Mild traumatic brain injury: a neuropsychiatric approach to diagnosis, evaluation, and treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2005 Dec;1(4):311-27.
40. Mathias JL, Wheaton P. Changes in attention and information-processing speed following severe traumatic brain injury: a meta-analytic review. *Neuropsychology*. 2007 Mar;21(2):212-23.
41. Hoofien D, Gilboa A, Vakil E, Donovick PJ. Traumatic brain injury (TBI) 10-20 years later: a comprehensive outcome study of psychiatric symptomatology, cognitive abilities and psychosocial functioning. *Brain Inj*. 2001 Mar;15(3):189-209.
42. Ruttan L, Martin K, Liu A, Colella B, Green RE. Long-term

cognitive outcome in moderate to severe traumatic brain injury: a meta-analysis examining timed and untimed tests at 1 and 4.5 or more years after injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008 Dec;89(12 Suppl):S69-76.

43. Mazaux JM, Masson F, Levin HS, Alaoui P, Maurette P, Barat M. Long-term neuropsychological outcome and loss of social autonomy after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997 Dec;78(12):1316-20.

44. Chamelian L, Feinstein A. The effect of major depression on subjective and objective cognitive deficits in mild to moderate traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2006 Winter;18(1):33-8.

45. Bechara A, Damasio H, Damasio AR. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2000 Mar;10(3):295-307.

46. Sidaros A, Engberg AW, Sidaros K, Liptrot MG, Herning M, Petersen P, et al. Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study. *Brain.* 2008 Feb;131(Pt 2):559-72.

47. Azouvi P. Neuroimaging correlates of cognitive and functional outcome after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol.* 2000 Dec;13(6):665-9.

48. Bendlin BB, Ries ML, Lazar M, Alexander AL, Dempsey RJ, Rowley HA, et al. Longitudinal changes in patients with traumatic brain injury assessed with diffusion-tensor and volumetric imaging. *Neuroimage.* 2008 Aug 15;42(2):503-14.

49. Perel P, Edwards P, Wentz R, Roberts I. Systematic review of prognostic models in traumatic brain injury. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2006;6:38.

50. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Jane JA, et al. The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma.* 1992 Mar;9 Suppl 1:S287-92.

51. Lezak M, Howieson D, Loring D. *Neuropsychological assessment.* New York: Oxford; 2004.

52. Rey A. *L'examen clinique en psychologie.* Paris: Press

Universitaire de France; 1958.

53. Wechsler D. WAIS-III: Manual para administração e avaliação. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2004.

54. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, Schroder N, Quevedo J, Benfato MS, et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 22;291(3):179-82.

55. Dal-Pizzol F, Quevedo J, Streck E, Walz R, Moreira JC. Changes in lipid composition in hippocampus early and late after status epilepticus induced by kainic acid in wistar rats. *Metab Brain Dis*. 2007 Mar;22(1):25-9.

56. Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML, Jr., Walz R, Andrades ME, da Silva EG, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med*. 2001 May 15;30(10):1137-44.

57. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ*. 1998 Apr 18;316(7139):1236-8.

58. Vanderploeg RD, Curtiss G, Luis CA, Salazar AM. Long-term morbidities following self-reported mild traumatic brain injury. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2007 Aug;29(6):585-98.

59. Chu BC, Millis S, Arango-Lasprilla JC, Hanks R, Novack T, Hart T. Measuring recovery in new learning and memory following traumatic brain injury: a mixed-effects modeling approach. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2007 Aug;29(6):617-25.

60. Leitgeb J, Mauritz W, Brazinova A, Janciak I, Majdan M, Wilbacher I, et al. Effects of Gender on Outcomes After Traumatic Brain Injury. *J Trauma*. 2011 Jul 29.

61. Andriessen TM, Horn J, Franschman G, van der Naalt J, Haitsma I, Jacobs B, et al. Epidemiology, severity classification, and outcome of moderate and severe traumatic brain injury: a prospective multicenter study. *J Neurotrauma*. 2011 Oct;28(10):2019-31.

62. Roozenbeek B, Lingsma HF, Perel P, Edwards P, Roberts I, Murray GD, et al. The added value of ordinal analysis in clinical trials: an example in traumatic brain injury. *Crit Care*. 2011;15(3):R127.

63. Gullo Jda S, Bertotti MM, Silva CC, Schwarzbald M, Diaz AP, Soares FM, et al. Hospital mortality of patients with severe traumatic brain injury is associated with serum PTX3 levels. *Neurocrit Care*. 2011 Apr;14(2):194-9.
64. Sigurdardottir S, Anđelic N, Roe C, Schanke AK. Cognitive recovery and predictors of functional outcome 1 year after traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc*. 2009 Sep;15(5):740-50.
65. Bombardier CH, Fann JR, Temkin NR, Esselman PC, Barber J, Dikmen SS. Rates of major depressive disorder and clinical outcomes following traumatic brain injury. *JAMA*. 2010 May 19;303(19):1938-45.
66. Brown AW, Malec JF, Mandrekar J, Diehl NN, Dikmen SS, Sherer M, et al. Predictive utility of weekly post-traumatic amnesia assessments after brain injury: A multicentre analysis. *Brain Inj*. 2010;24(3):472-8.
67. Senathi-Raja D, Ponsford J, Schonberger M. Impact of age on long-term cognitive function after traumatic brain injury. *Neuropsychology*. 2010 May;24(3):336-44.
68. Himanen L, Portin R, Isoniemi H, Helenius H, Kurki T, Tenovuo O. Longitudinal cognitive changes in traumatic brain injury: a 30-year follow-up study. *Neurology*. 2006 Jan 24;66(2):187-92.
69. Fraser RTC, D.C. Traumatic brain injury rehabilitation: practical, vocational, neuropsychological, and psychotherapy interventions. Boca Raton: CRC Press; 2000.
70. Ponsford J, Harrington H, Olver J, Roper M. Evaluation of a community-based model of rehabilitation following traumatic brain injury. *Neuropsychol Rehabil*. 2006 Jun;16(3):315-28.
71. Schwarzbald ML, Rial D, De Bem T, Machado DG, Cunha MP, dos Santos AA, et al. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma*. 2010 Oct;27(10):1883-93.
72. Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts

intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci.* 2008 Apr;11(4):476-87.

Tabela 1. Variáveis Clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas de pacientes com TCE grave avaliados e não avaliados cognitivamente.

Variáveis	Todos os Pacientes N = 172 (%)	Avaliação Cognitiva		p valor
		Não Avaliado n = 126 (73.3%)	Avaliado n = 46 (26.7%)	
Sexo				
Masculino	147 (85.5%)	108 (85.7)	39 (84.8)	
Feminino	25 (14.5%)	18 (14.3)	07 (15.2)	1.0
Idade (anos), média (± DP)	34.44 (16.6)	34.5 (17.7)	34.1 (13.6)	0.89
Glicemia^a, média (± DP)	155.9 (60.41)	155.6 (56.8)	156.6 (70.1)	0.93
Classificação Marshall CT^b				
Dano Tipo I	7 (4.1)	5 (4.0)	2 (4.3)	
Dano Tipo II	41 (23.8)	31 (24.6)	10 (21.7)	
Dano Tipo III	44 (25.6)	32 (25.4)	12 (26.1)	
Dano Tipo IV	12 (7.0)	8 (6.3)	4 (8.7)	
Lesão de massa Evacuada	44 (25.6)	31 (24.6)	13 (28.3)	
Lesão de massa não Evacuada	16 (9.3)	12 (9.5)	4 (8.7)	0.90
HSA^c				
Não	97 (56.4)	76 (60.3)	21 (45.7)	
Sim	71 (41.3)	48 (38.1)	23 (50.0)	0.15
Trauma Associado				
Sim	106 (61.6)	76 (60.3)	30 (65.2)	
Não	66 (38.4)	50 (39.7)	16 (34.8)	0.59
Tipo de Trauma Associado				
Coluna				
Sim	14 (8.1)	12 (9.5)	2 (4.3)	
Não	158 (91.9)	114 (90.5)	44 (95.7)	0.35
Tórax				
Sim	42 (24.4)	31 (24.6)	11 (23.9)	
Não	130 (75.6)	95 (75.4)	35 (76.1)	1.0
Abdominal				
Não	163 (94.8)	119 (94.4)	44 (95.7)	
Sim	9 (5.2)	7 (5.6)	2 (4.3)	1.0
Membros				
Sim	53 (30.8)	40 (31.7)	13 (28.3)	
Não	119 (69.2)	86 (68.3)	33 (71.7)	0.71
Escala Como Glasgow^d				
7 ou 8	77 (44.8)	55 (43.7)	22 (47.8)	
5 ou 6	50 (29.1)	40 (31.7)	10 (21.7)	
3 ou 4	45 (26.2)	31 (24.6)	14 (30.4)	0.42
Pupila^e				
Isocórica	106 (61.6)	81 (64.3)	25 (54.3)	
Anisocórica	58 (33.7)	39 (31.0)	19 (41.3)	
Midriática	6 (3.5)	5 (4.0)	1 (2.2)	0.38

a A glicemia não foi avaliada em 11 pacientes b Escala de Marshall não foi avaliada em 4 pacientes c HSA = A presença ou não de Hemorragia Subaracnóidea não foi confirmada em 4 pacientes d A escala de coma de Glasgow da admissão de um paciente não foi avaliada no protocolo de pesquisa. e Dois pacientes tiveram trauma ocular e as pupilas não puderam ser adequadamente avaliadas.

Tabela 2. Características e avaliação neuropsicológica de controles e pacientes com TCE grave.

Variáveis	Grupo		"p" Valor
	Pacientes n = 46 (66.7%)	Controles n = 23 (33.3%)	
SEXO			
Masculino/ Feminino	39 (84.8) / 7 (15.2)	18 (78.3) / 5 (21.7)	0.51
Idade em anos, Média (± DP)	34.1 (13.6)	35.9 (12.3)	0.61
Educação em anos, Média (± DP)	9.0 (4.7)	9.6 (4.5)	0.49
Dominância manual			
Direita / Esquerda ou ambos	38 (88.4) / 05 (11.6)	22 (95.7) / 01 (4.3)	0.65
Testes Cognitivos			
Fluência Letras	(n = 41)	(n = 22)	
Média (DP)	19.7 (15.8)	28.3 (8.6)	0.001
Fluência Categórica	(n = 44)	(n=23)	
Média (DP)	9.9 (5.3)	15.3 (4.3)	0.001
RAVLT			
Total, Média (DP)	31.1 (13.6)	45.0 (10.3)	< 0.001
Retenção, Média (DP)	4.9 (3.6)	8.9 (2.9)	< 0.001
Tardio, Média (DP)	4.7 (3.6)	9.4 (2.9)	< 0.001
WMS – III			
Memória Lógica, Primeira Evocação	(n = 42)	(n = 23)	
Média (DP)	16.4 (8.9)	21.5 (7.2)	0.02
Memória Lógica I	(n = 42)	(n = 23)	
Média (DP)	26.5 (13.6)	35.5 (9.9)	< 0.01
Memória Lógica II	(n=42)	(n=23)	
Média (DP)	12.7 (10.5)	21.2 (8.5)	0.001
Reprodução Visual I	(n=45)	(n = 23)	
Média (DP)	57.5 (28.0)	78.4 (19.0)	0.002
Reprodução Visual II	(n = 45)	(n = 23)	
Média (DP)	33.0 (24.3)	61.5 (22.6)	< 0.0001
Reprodução Visual, Rec.	(n = 42)	(n = 23)	
Média (DP)	38.9 (8.1)	42.5 (3.3)	0.001
WAIS – III			
Números	(n=45)	(n=23)	
Média (DP)	10.9 (4.7)	13.0 (3.9)	0.06
Semelhanças	(n = 41)	(n = 23)	
Média (DP)	16.8(7.9)	20.5 (7.8)	0.06
Vocabulário	(n = 44)	(n = 23)	
Média (DP)	25.6 (14.0)	31.4 (9.9)	0.06
Cubos	(n = 45)	(n = 23)	
Média (DP)	26.7 (13.7)	34.3 (12.4)	0.03

Tabela 3a. Associação entre as variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e neurocirúrgicas, e linguagem e desempenho nos testes WAIS-III nos pacientes de TBI.

Variáveis	Fluência Categorica	Números	Semelhanças	Vocabulário	Cubos
Educação^a	B = 0.57 R = 0.51 R squ = 0.27 p < 0.001	B = 0.52 R = 0.54 R squ = 0.30 p < 0.0001	B = 1.25 R = 0.75 R squ = 0.56 p < 0.0001	B = 1.95 R = 0.66 R squ = 0.44 p < 0.0001	B = 1.25 R = 0.44 R squ = 0.19 p = 0.003
Idade (anos)^a	B = -0.20 R = 0.53 R squ = 0.28 p < 0.001	B = -0.12 R = 0.35 R squ = 0.35 p = 0.02	B = -0.18 R = 0.30 R squ = 0.09 p = 0.06	B = -0.16 R = 0.16 R squ = 0.02 p = 0.31	B = -0.55 R = 0.55 R square = 0.31 p < 0.0001
Glicemia^b	Média (DF) 10.2 (5.2) 8.8 (5.2) p = 0.41	Média (DF) 11.0 (4.3) 10.4 (5.4) p = 0.68	Média (DF) 16.6 (8.0) 18.1 (8.3) p = 0.60	Média (DF) 25.7 (13.0) 25.7 (16.4) p = 1.0	Média (DF) 28.3 (13.1) 24.5 (15.5) p = 0.41
Admissão TC (Marshall)^{b, e}	Mean (SD) 11.5 (4.3) 8.1 (5.8) p = 0.03	Média (DP) 12.5 (4.1) 9.2 (4.7) p = 0.02	Média (DP) 18.5 (6.5) 15.1 (9.2) p = 0.18	Média (DP) 30.7 (12.1) 20.0 (14.0) p = 0.01	Média (DP) 32.0 (11.5) 21.2 (13.9) p = 0.007
HSA na admissão CT^{b, f}	Mean (SD) 5.2 (1.1) 5.1 (1.1) p = 0.87	Média (DP) 10.8 (4.4) 10.9 (4.9) p = 0.94	Média (DP) 17.6 (7.1) 15.6 (7.2) p = 0.39	Média (DP) 28.2 (14.0) 22.7 (12.7) p = 0.19	Média (DP) 30.4 (12.8) 21.1 (13.8) p = 0.08
Escala Coma Glasgow^c	Média (DF) 11.1 (5.0) 9.4 (3.9) 8.2 (6.2) p = 0.27	Média (DF) 12.1 (4.9) 10.3 (4.3) 9.2 (4.3) p = 0.20	Média (DF) 19.0 (8.1) 14.4 (4.8) 14.9 (9.1) p = 0.24	Média (DP) 28.1 (15.2) 24.7 (10.1) 21.8 (14.3) p = 0.44	Média (DP) 30.1 (12.5) 26.7 (13.8) 21.8 (14.6) p = 0.21
Admissão Pupilas^a	Média (DF) 10.8 (4.7) 8.9 (5.9) p = 0.26	Média (DF) 11.6 (5.0) 10.0 (4.4) p = 0.26	Média (DF) 17.2 (8.7) 16.5 (7.2) p = 0.79	Média (DP) 28.0 (14.9) 22.5 (13.0) p = 0.21	Média (DP) 29.8 (14.0) 23.6 (12.5) p = 0.14

^a Associação entre variáveis contínuas e teste cognitivo avaliado pela regressão linear univariada;

^b Associação entre variáveis categóricas e teste cognitivo avaliado pelo teste "t" Student; ^c

Associação entre variáveis categóricas e teste cognitivos avaliado pelo ANOVA uma via; ^d Entre os pacientes com pupila anormal de admissão 19 foram anemocóricas e 1 foi midriática. Pupilas não foram examinadas em 1 paciente com trauma ocular; ^e Resultados do TC não foi avaliado em 1 caso; ^f Presença de hemorragia subaracnóidea (HSA) avaliável em 2 casos. B = Coeficiente de B não padronizado da Regressão Linear; R = Coeficiente de Pearson; R squ = Coeficiente quadrado de R.

Tabela 3b. Associação entre variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais, radiológicas e neurocirúrgicas e desempenho nos testes de memória de pacientes com TCE.

Variáveis	RAVLT Total	RAVLT Retenção	RAVLT Tardio	RV I	RV II	RV Rec	ML 1 st	ML II
Educação^a	B = 1.34 R = 0.47 R squ = 0.22 p < 0.0001	B = 0.25 R = 0.33 R squ = 0.11 p = 0.02	B = 0.24 R = 0.31 R squ = 0.10 p = 0.03	B = 2.39 R = 0.41 R squ = 0.16 p < 0.0001	B = -1.37 R = 0.27 R squ = 0.07 p = 0.008	B = 0.17 R = 0.10 R squ = 0.10 p < 0.0001	B = 0.78 R = 0.41 R squ = 0.17 p = 0.002	B = -1.05 R = 0.47 R squ = 0.22 p = 0.36
Idade (anos)^a	B = -0.58 R = 0.58 R squ = 0.34 p < 0.0001	B = -0.14 R = 0.53 R squ = 0.28 p < 0.0001	B = -0.15 R = 0.58 R squ = 0.34 p < 0.0001	B = -1.14 R = 0.56 R squ = 0.32 p < 0.0001	B = -1.01 R = 0.57 R squ = 0.33 p < 0.0001	B = -0.23 R = 0.40 R squ = 0.16 p = 0.0001	B = -0.34 R = 0.52 R squ = 0.34 p < 0.0001	B = -0.47 R = 0.61 R squ = 0.37 p < 0.0001
Glicemia na admissão^b	Média (DP) 32.5 (11.8) 27.9 (14.7) p = 0.28	Média (DP) 5.4 (3.1) 3.6 (3.7) p = 0.11	Média (DP) 4.8 (3.4) 4.1 (3.7) p = 0.54	Média (DP) 60.1 (22.5) 50.4 (35.4) p = 0.25	Média (DP) 35.5 (21.4) 27.8 (28.8) p = 0.33	Média (DP) 39.3 (9.5) 38.7 (5.0) p = 0.84	Média (DP) 16.7 (7.9) 15.6 (11.5) p = 0.74	Média (DP) 12.9 (9.7) 11.9 (12.9) p = 0.80
CT (Marshall) na admissão^{c,e}	Média (DP) 37.8 (9.9) 23.7 (12.9) p < 0.0001	Média (DP) 6.3 (3.1) 3.3 (3.4) p = 0.04	Média (DP) 5.9 (3.3) 3.3 (3.5) p = 0.02	Média (DP) 65.6 (24.3) 49.7 (29.6) p = 0.06	Média (DP) 41.6 (24.1) 24.0 (21.3) p = 0.01	Média (DP) 41.1 (9.1) 36.8 (5.9) p = 0.09	Média (DP) 19.8 (7.7) 11.9 (8.7) p = 0.004	Média (DP) 16.0 (9.3) 8.4 (11.0) p = 0.02
HSA na CT de admissão^{c,e}	Média (DP) 33.1 (12.8) 30.1 (13.9) p = 0.47	Média (DP) 5.5 (3.4) 4.5 (4.0) p = 0.40	Média (DP) 5.1 (3.4) 4.5 (3.9) p = 0.57	Média (DP) 62.6 (27.6) 53.2 (27.6) p = 0.27	Média (DP) 36.4 (24.8) 31.1 (24.6) p = 0.48	Média (DP) 40.1 (9.7) 38.4 (6.3) p = 0.53	Média (DP) 19.0 (7.5) 13.6 (9.1) p = 0.05	Média (DP) 15.5 (9.1) 9.5 (10.8) p = 0.07
Escala Coma Glasgow^c	Média (DP) 33.2 (13.3) 30.8 (10.2) 17.5 (16.1) p = 0.50	Média (DP) 6.0 (3.7) 3.9 (3.3) 3.8 (3.0) p = 0.14	Média (DP) 5.8 (3.6) 3.9 (3.3) 3.2 (3.4) p = 0.09	Média (DP) 65.4 (24.1) 53.4 (33.0) 48.6 (28.4) p = 0.20	Média (DP) 38.3 (23.6) 35.4 (29.0) 23.4 (20.1) p = 0.20	Média (DP) 40.3 (4.5) 36.4 (6.8) 36.9 (12.0) p = 0.52	Média (DP) 17.7 (8.3) 15.3 (10.5) 15.8 (9.1) p = 0.62	Média (DP) 14.6 (10.0) 13.0 (10.9) 8.8 (11.0) p = 0.32
Pupilas na admissão^{d,1}	Média (DP) 33.2 (12.7) 29.0 (14.7) p = 0.31	Média (DP) 5.3 (3.5) 4.4 (3.7) p = 0.40	Média (DP) 5.3 (3.5) 4.2 (3.7) p = 0.33	Média (DP) 60.6 (27.9) 55.3 (28.1) p = 0.54	Média (DP) 38.6 (24.5) 26.7 (21.6) p = 0.11	Média (DP) 38.2 (6.5) 40.5 (10.1) p = 0.37	Média (DP) 17.3 (9.7) 15.2 (8.0) p = 0.48	Média (DP) 14.1 (10.2) 11.2 (10.8) p = 0.37

^a Associação com testes cognitivos avaliada por regressão linear univariada; ^b Associação com testes cognitivos avaliada pelo teste "t" Student; ^c Associação com testes cognitivos avaliada pela ANOVA de uma via; ^d TC não foi avaliada em 1 caso; ^e Presença de hemorragia subaracnóidea (HSA) não avaliada em 2 casos; ¹ Pupilas não foram examinadas em 1 paciente com trauma ocular, 19 pacientes com pupilas anisocóricas e 1 com midriase bilateral; B = Coeficiente B da Regressão Linear; R = Coeficiente R de Pearson; R squ = coeficiente R quadrado.

Tabela 4. Modelo de regressão logística múltipla linear que melhor explica a associação independente entre o desempenho cognitivo de longo prazo nos testes cognitivos e as variáveis clínicas, demográficas, radiológicas e neurocirurgias dos pacientes sobreviventes de TCE grave.

TESTES COGNITIVOS E VARIÁVEIS INDEPENDENTES	Constante	R coeficiente	R quadrado	B coeficiente	Nível "p"
Fluência Letras					
Idade (anos)	14.2	0.67	0.45	- 0.23	0.01
Escolaridade (anos)				1.16	< 0.0001
Fluência Categórica					
Idade (anos)	11.5	0.71	0.50	- 0.20	< 0.0001
Escolaridade (anos)				0.52	< 0.0001
Números					
Idade (anos)	9.8	0.61	0.37	- 0.10	0.03
Escolaridade (anos)				0.49	< 0.0001
Semelhanças					
Idade (anos)	10.2	0.80	0.61	- 0.13	0.04
Escolaridade (anos)				1.20	< 0.0001
Vocabulário					
Escolaridade (anos)	13.1	0.69	0.47	1.72	< 0.0001
TC Classe \geq 4 de Marshal				- 6.07	0.08
Cubos					
Idade (anos)	34.3	0.67	0.45	- 0.50	< 0.0001
Educação (anos)				1.10	0.02
RAVLT-Total					
Idade (anos)	38.4	0.71	0.51	- 0.54	< 0.0001
Educação (anos)				1.20	< 0.0001
RAVLT- Retenção					
Idade (anos)	7.1	0.63	0.40	- 0.11	0.001
Educação (anos)				0.23	0.01
Admissão Glicose \geq 150 mg/dl				- 1.92	0.04
RAVLT- Tardio					
Idade (anos)	7.8	0.64	0.41	- 0.15	0.04
Educação (anos)				0.20	< 0.0001
RV I					
Idade (anos)	75.6	0.66	0.43	-1.10	< 0.0001
Educação (anos)				2.02	0.005
RV II					
Idade (anos)	56.7	0.61	0.37	- 0.97	< 0.0001
Educação (anos)				1.04	0.11
RV Rec					
Idade (anos)	47.1	0.40	0.16	- 0.23	0.008
ML1st					
Idade (anos)	21.6	0.65	0.43	- 0.26	0.004
Educação (anos)				0.58	0.02
TC Classe \geq IV de Marshal				- 4.06	0.10
ML I					
Idade (anos)	33.6	0.64	0.41	- 0.49	< 0.0001
Educação (anos)				1.02	0.007
ML II					
Idade (anos)	19.8	0.69	0.47	- 0.46	< 0.0001
TC de admissão sem HSA				5.37	0.03

Tabela 5. Variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais, radiológicas, neurocirúrgicas e marcadores e níveis plasmáticos de estresse oxidativo dos pacientes vítimas de TCE grave.

Variáveis	Todos os pacientes	Avaliação cognitiva		Valor de "P"	
		Não realizada n = 29 (56,9%)	Realizada n = 22 (43,1%)		
Sexo					
Masculino	45 (88.2)	25 (85.2)	20 (90.9)	0.68 ^a	
Feminino	06 (11.8)	04 (13.8)	02 (9.1)		
Classificação de Marshall da TC					
Injúria tipo I	03 (5.9)	01 (3.4)	02 (9.1)	0.96 ^b	
Injúria tipo II	17 (33.3)	10 (34.5)	07 (31.8)		
Injúria tipo III	05 (9.8)	03 (10.3)	02 (9.1)		
Injúria tipo Type IV	06 (11.8)	03 (10.3)	03 (13.6)		
Lesão expansiva operada	10 (19.6)	06 (20.7)	04 (18.2)		
Lesão expansiva não operada	10 (19.6)	06 (20.7)	04 (18.2)		
Presença de HSA na TC de admissão					
Sim	27 (52.9)	13 (44.8)	14 (63.6)		0.26 ^a
Não	24 (47.1)	16 (55.2)	08 (36.4)		
Realizou neurocirurgia					
Não	25 (49)	15 (51.7)	10 (45.5)	0.44 ^b	
Sim	26 (51)	14 (48.3)	12 (54.5)		
Trauma Associado					
Sim	33 (64.7)	17 (56.6)	16 (72.7)	0.38 ^a	
Não	18 (35.3)	12 (41.4)	06 (27.3)		
Tipo de trauma associado					
Tórax					
Sim	08 (15.7)	05 (17.20)	03 (13.6)	0.52 ^a	
Não	43 (84.3)	24 (82.8)	19 (86.4)		
Abdominal					
Sim	02 (3.9)	01 (3.4)	01 (4.5)	1.0 ^a	
Não	49 (96.1)	28 (96.6)	21 (95.5)		
Membros					
Sim	12 (23.5)	07 (24.1)	05 (22.7)	1.0 ^a	
Não	39 (76.5)	22 (75.9)	17 (77.3)		
Escala de Coma de Glasgow na admissão					
7 ou 8	24 (47.1)	13 (44.8)	11 (50.0)	0.73 ^b	
5 ou 6	12 (23.5)	08 (27.6)	04 (18.2)		
3 ou 4	15 (29.4)	8 (27.6)	07 (31.8)		

Variáveis	Todos os pacientes	Avaliação cognitiva		Valor de "P"
		Não realizada n = 29 (56,9%)	Realizada n = 22 (43,1%)	
Pupilas na admissão				
Isocóricas	31 (60.8)	17 (58.6)	14 (63.6)	0.45 ^b
Anisocóricas	18 (35.3)	10 (34.5)	08 (36.4)	
Midriáticas	02 (3.9)	2 (6.9)	0	
Dados expressos em média (± DP)				
Idade em anos	33.5 (14.2)	34.8 (16.2)	31.7 (11.1)	0.45 ^c
Dias de internação na UTI	12 (7)	12 (8)	11 (5)	0.51 ^c
Dias de Hospitalização	29 (21)	30 (19)	28 (23)	0.77 ^c
Pressão arterial sistólica	128 (30)	127 (27)	128 (35)	0.97 ^c
Frequência cardíaca	89 (20)	90 (15)	90 (25)	0.52 ^d
Frequência respiratória	21 (13)	22 (18)	18 (14)	0.66 ^d
Glicemia (mg/dl)	154 (61)	158 (74)	149 (39)	0.78 ^d
Hematócrito (%)	33.7 (6.5)	34.2 (5.3)	33.1 (87.9)	0.56 ^c
Hemoglobina (g / 100ml)	12.4 (4.8)	11.7 (1.8)	13.2 (7.9)	0.49 ^d
Leucócitos (mm ³)	15475 (7374)	15578 (6976)	15346 (8024)	0.92 ^c
Dados expressos em mediana (Intervalo IQ 25% - 75%)				
Níveis plasmáticos de Carbonil (nmol/mg proteína 10¹⁴)				
Amostra primeiro sangue (n = 51)	25.3 (9.3 – 93.0)	25.3 (9.0 – 86.6)	26.2 (9.5 – 95.0)	0.89 ^d
Amostra segundo sangue (n = 42)	40.0 (12.6 – 108.5)	32.6 (10.3 – 110.8)	52.7 (16.9 – 145.3)	0.33 ^d
Amostra terceiro sangue (n = 42)	38.3 (15.8 – 140.5)	33.2 (14.6 – 142.0)	46.3 (18.8 – 145.0)	0.73 ^d
Níveis plasmáticos de TBARS (nmol/mg proteína 10⁸)				
Amostra primeiro sangue (n = 51)	61.6 (10.2 – 197.0)	38.9 (13.4 – 196.9)	48.7 (8.1 – 199.5)	0.95 ^d
Amostra segundo sangue (n = 42)	35.2 (16.6 – 235.6)	23.1 (14.7 – 242.9)	44.6 (33.0 – 236.0)	0.12 ^d
Amostra terceiro sangue (n = 42)	73.7 (58.2 – 369.5)	74.5 (53.2 – 417.3)	72.9 (59.2 – 321.3)	0.99 ^d

Os exames laboratoriais apresentados foram realizados na primeira amostra de sangue em que também foram quantificados os níveis de TBARS e Carbonil. A coleta foi feita numa mediana de 10 (IQ 24-75 = 10 -23) horas após o TCE.

As variáveis hemodinâmicas são as observadas no momento da coleta da primeira amostra de sangue.

A segunda amostra de sangue foi coletada numa mediana de 29 (IQ 24-75 = 24 – 38) horas após o TCE.

A terceira amostra de sangue foi coletada numa mediana de 70 (IQ 25-74 = 52 – 78) horas após o TCE.

Os níveis de TBARS and Carbonil não foram quantificados na segunda e terceira amostras de 9 pacientes.

A GLICEMIA NÃO FOI ANALISADA EM 3 PACIENTES.

^a Níveis de significância analisados pelo teste exato de Fisher.

^b Níveis de significância determinados pelo teste do Qui-quadrado.

^c Níveis de significância determinados pelo teste "t" de Student.

^d Níveis de significância determinados pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 6. Características demográficas, sócio-culturais e desempenho cognitivo dos pacientes e controles.

Variáveis	Grupo		Valores de "p" ^a
	Pacientes (n = 22)	Controles (n = 23)	
SEXO			
Masculino	20 (90.9)	18 (78.3)	
Feminino	5 (9.1)	5 (21.7)	0.41 ^b
Idade em anos, Média (± DP)	31.7 (11.1)	35.9 (12.3)	0.61
Escolaridade, em anos, Média (± DP)	8.4 (4.8)	9.6 (4.5)	0.49
Dominância manual			
Destro	19 (86.4)	22 (95.7)	
Canhoto ou ambidestro	03 (13.6)	01 (4.3)	0.35 ^c
Testes Cognitivos, Média (± DP)			
Fluência de Letras	15.6 (9.1)	28.3 (8.6)	< 0.0001
Fluência Categórica	9.6 (4.5)	15.3 (4.3)	< 0.0001
RAVLT			
Total	34.1 (12.6)	45.0 (10.3)	0.003
Retention	5.9 (3.5)	8.9 (2.9)	0.004
Delayed	5.9 (3.7)	9.4 (2.9)	0.001
WMS – III			
Memória Lógica, Primeira Evocação	15.4 (8.7)	21.5 (7.2)	0.01
Memória Lógica I	25.5 (13.4)	35.5 (9.9)	0.007
Memória Lógica II	14.0 (10.5)	21.2 (8.5)	0.02
Reprodução Visual I	61.9 (28.1)	78.4 (19.0)	0.02
Reprodução Visual II	35.2 (24.3)	61.5 (22.6)	0.001
Reprodução visual, Reconhecimento	40.1 (10.5)	42.5 (3.3)	0.31
WAIS – III			
Span de dígitos	10.4 (4.4)	13.0 (3.9)	0.08
Similaridades	15.9 (7.7)	20.5 (7.8)	0.06
Vocabulário	22.8 (11.6)	31.4 (9.9)	0.01
Desenho de cubos	26.7 (13.7)	34.3 (12.4)	0.05

^a Diferenças significativas pelo teste "t" de Student; ^b Teste exato de Fisher; ^c Teste do Qui-quadrado.

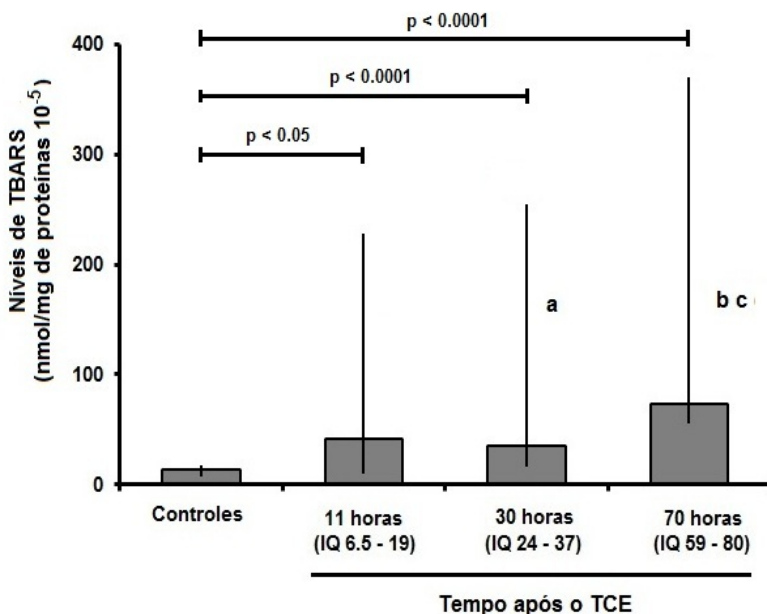


Figura 3A. Níveis plasmáticos de TBARS medidos em controles e pacientes numa mediana de 11, 30, e 70 horas após o TCE grave. Os níveis de TBARS foram significativamente mais elevados que os controles em 11 (n = 22), 30 (n = 21) e 70 horas (n = 19) após o TCE. Quando comparado à medida feita 11 horas, os níveis de TBARS foram significativamente mais elevados 30 horas ($p < 0.05$)^a e 70 horas ($p < 0.005$)^b; Quando comparado à medida feita 30 horas, os níveis de TBARS foram significativamente mais elevados 70 horas ($p < 0.005$)^c. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ 25 e 75). Diferenças entre as medidas realizadas nos pacientes e controles foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças entre diferentes tempos após o TCE foram analisadas através do teste de Wilcoxon.

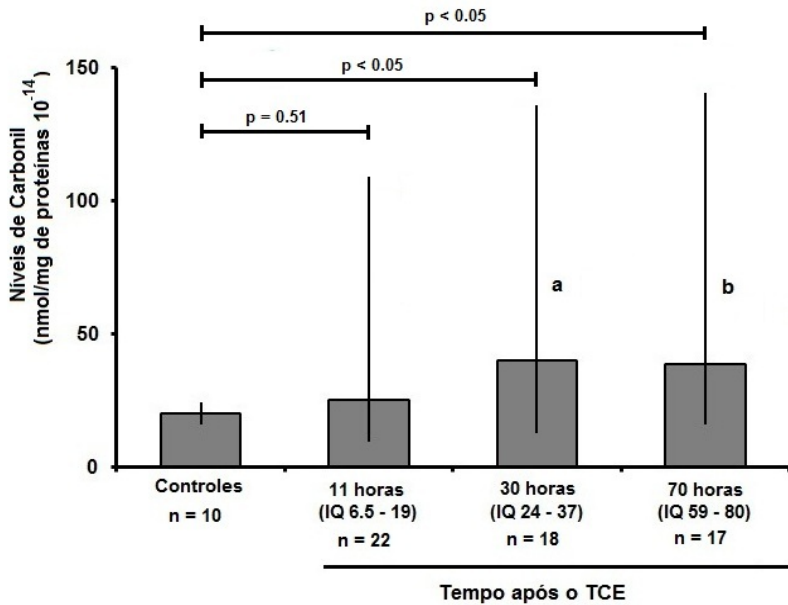


Figura 3B. Níveis plasmáticos de Carbonil medidos em controles e pacientes numa mediana de 11, 30, e 70 horas após o TCE grave. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e a medida realizada 11 horas após o TCE. Quando comparado aos controles, os níveis de carbonil foram significativamente mais elevados 30 ($n = 21$) e 70 horas ($n = 19$) após o TCE ; Quando comparado à medida feita 11 horas ($n = 11$), os níveis de Carbonil foram significativamente mais elevados 30 horas ($p < 0.005$)^a e 70 horas ($p < 0.01$)^b após o TCE. Não houve variações estatisticamente significativas nos níveis de carbonil medidos 30 e 70 horas após o TCE ($p = 0.51$). Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ 25 e 75). Diferenças entre as medidas realizadas nos pacientes e controles foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças entre diferentes tempos após o TCE foram analisadas através do teste de Wilcoxon.

Tabela 7. Correlação entre os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil dos pacientes sobreviventes de TCE grave e o desempenho cognitivo tardio em testes neuropsicológicos.

TESTES COGNITIVOS E VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	Coefficiente rho de Spearman	Nível de "p"	TESTES COGNITIVOS E VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	Coefficiente rho de Spearman	Nível de "p"
Fluência de letras			RAVLT-tardio		
Níveis de TBARS			Níveis de TBARS		
Primeira amostra	0.26	0.26	Primeira amostra	- 0.08	0.74
Segunda amostra	0.14	0.56	Segunda amostra	0.23	0.37
Terceira amostra	0.14	0.60	Terceira amostra	0.26	0.34
Níveis de Carbonil			Níveis de Carbonil		
Primeira amostra	- 0.34	0.13	Primeira amostra	- 0.03	0.88
Segunda amostra	- 0.20	0.43	Segunda amostra	- 0.10	0.69
Terceira amostra	0.03	0.90	Terceira amostra	0.32	0.23
Fluência Categórica			VP II		
Níveis de TBARS			Níveis de TBARS		
Primeira amostra	0.12	0.61	Primeira amostra	0.12	0.60
Segunda amostra	0.11	0.66	Segunda amostra	0.23	0.36
Terceira amostra	0.15	0.57	Terceira amostra	0.39	0.11
Níveis de Carbonil			Níveis de Carbonil		
Primeira amostra	- 0.25	0.27	Primeira amostra	- 0.06	0.78
Segunda amostra	- 0.21	0.41	Segunda amostra	- 0.03	0.89
Terceira amostra	0.08	0.76	Terceira amostra	0.27	0.28
Similaridades			VP Reconhecimento		
Níveis de TBARS			Níveis de TBARS		
Primeira amostra	0.34	0.14	Primeira amostra	- 0.01	0.95
Segunda amostra	0.26	0.32	Segunda amostra	0.14	0.59
Terceira amostra	0.30	0.26	Terceira amostra	0.16	0.56
Níveis de Carbonil			Níveis de Carbonil		
Primeira amostra	- 0.09	0.67	Primeira amostra	0.09	0.68
Segunda amostra	0.24	0.38	Segunda amostra	- 0.01	0.98
Terceira amostra	0.10	0.71	Terceira amostra	0.21	0.42
Vocabulário			ML 1ª evocação		
Níveis de TBARS			Níveis de TBARS		
Primeira amostra	0.27	0.24	Primeira amostra	0.24	0.30
Segunda amostra	0.32	0.20	Segunda amostra	0.32	0.21
Terceira amostra	0.50	0.04 *	Terceira amostra	0.14	0.60
Níveis de Carbonil			Níveis de Carbonil		
Primeira amostra	- 0.05	0.82	Primeira amostra	- 0.04	0.86
Segunda amostra	0.22	0.39	Segunda amostra	0.10	0.97
Terceira amostra	0.24	0.27	Terceira amostra	0.08	0.75
Desenho de cubos			ML I		
Níveis de TBARS			Níveis de TBARS		
Primeira amostra	0.42	0.05	Primeira amostra	0.27	0.24
Segunda amostra	0.26	0.29	Segunda amostra	0.34	0.20
Terceira amostra	0.40	0.10	Terceira amostra	0.20	0.44
Níveis de Carbonil			Níveis de Carbonil		
Primeira amostra	0.10	0.66	Primeira amostra	- 0.05	0.83
Segunda amostra	0.06	0.82	Segunda amostra	0.04	0.89
Terceira amostra	0.26	0.30	Terceira amostra	0.14	0.61
RAVLT-Total			ML II		
Níveis de TBARS			Níveis de TBARS		
Primeira amostra	0.15	0.53	Primeira amostra	0.17	0.45
Segunda amostra	0.23	0.37	Segunda amostra	0.03	0.91
Terceira amostra	0.26	0.34	Terceira amostra	0.08	0.77
Níveis de Carbonil			Níveis de Carbonil		
Primeira amostra	- 0.03	0.88	Primeira amostra	- 0.09	0.70
Segunda amostra	- 0.10	0.69	Segunda amostra	- 0.24	0.36
Terceira amostra	0.32	0.23	Terceira amostra	- 0.02	0.94

Os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil da primeira amostra de sangue foram analisados em todos os pacientes.

Os níveis plasmáticos de TBARS e Carbonil da segunda e terceira amostra foram analisados em 21 pacientes e 19 pacientes respectivamente.

* A correlação significativa observada entre os níveis de TBARS medidos na terceira amostra de sangue e o vocabulário não foram confirmados ($p = 0.23$) após o ajuste para a idade e classificação de Marshall (ver resultados no texto).

ANEXOS

ANEXO 1

Submetido para: Journal of Neuropsychology

Hospitalization variables and the long-term cognitive prognosis after severe traumatic brain injury: a prospective study

Maria Emília Rodrigues de Oliveira Thais,¹ Gisele Cavallazzi¹, Douglas Afonso Formolo,¹ Lucas D'Ávila de Castro¹, Roseli Schmoeller,¹ Ricardo Guarnieri,^{1,2} Marcelo Liborio Schwarzbold,¹ Alexandre Paim Diaz,^{1,2} Alexandre Hohl,¹ Rui D. S. Prediger,^{1,3} Maria Joana Mader,⁵ Marcelo Neves Linhares,^{1,2,4} Hans J. Markowitsch,⁶ Roger Walz^{1,2,7}

1. Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil
2. Centro de Epilepsia do Estado de Santa Catarina (CEPESC), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil
3. Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis-SC, Brazil.
4. Unidade de Neurocirurgia, Serviço de Cirurgia, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil
5. Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil
6. Physiological Psychology, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany
7. Departamento de Clínica Médica, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

Corresponding author: Prof. Dr. Roger Walz, M.D., Ph.D., Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, 3º andar, UFSC, Campus Universitário, Trindade Florianópolis, SC, Brazil. Prof. Hans J. Markowitsch was a visitor professor of Centro de Epilepsia do Estado de Santa Catarina and Centro de

Neurociências Aplicadas (CeNAp), HU, UFSC.

Acknowledgments. This work was supported by CNPq (Brazilian Council for Scientific and Technologic Development, Brazil), FAPESC (Foundation for Scientific Research and Technology of the State of Santa Catarina).

Objectives: Traumatic brain injury (TBI) is a main cause of mortality and morbidity. Association studies between hospitalization variables and cognitive impairment after TBI are frequently retrospective, including non-consecutive patients showing variable degrees of TBI severity and poor management of missing cases.

Methods: We assessed prospectively the demographic and hospitalization variables of 234 consecutive patients with severe TBI (admission GCS ≤ 8) and determine their independent association with cognitive performance in a representative sample ($n=46$) of surviving patients ($n=172$) evaluated $3 (\pm 1.8)$ years after hospitalization.

Results: 85% of patients were male and the mean age was 34 ($SD\pm 13$) years. The education level was 9 (± 4.7) years. Linear regression models including education and age, showed a moderately to strong linear relationship with the cognitive performance in 14 of 15 neuropsychological tests (R coefficient = 0.6 to 0.8). Cognitive test scores were not independently associated with gender, admission of GCS, associated trauma and Marshal CT classification. Admission elevated glucose levels and presence of sub-arachnoids hemorrhage were independently associated with lower scores in Rey Auditory Verbal Learning retention and Logical Memory I tests respectively.

Conclusions: Lower education and higher age are important predictors of long-term cognitive disability after severe TBI in Brazilian patients. Variables commonly associated with mortality including pupils' examination, CT Marshal Classification, GCS, serum glucose trauma had a limited predictive value for cognitive recovery in our patients. Identification of isolated or combined clinical and laboratorial variables associated to cognitive recovery after severe TBI is an important challenge for clinical neuropsychology.

Key words: Traumatic brain injury; neuropsychology; cognitive prognosis; prediction models.

Conflict of Interest: The authors declare that we have no conflicts of interest in the authorship or publication of this contribution.

1. Introduction

With an incidence rate of 150-300 per 100,000 per year of hospitalized and fatal traumatic brain injuries (TBI) in Europe – and higher in other parts of the world – head trauma is likely to be the most probable etiology of cognitive disorders due to a general medical condition (Markowitsch & Staniloiu). TBI patients frequently suffer from long-term sequelae which have personal, family, and social impact (Marsh & Kersel, 2006). These sequelae are highly heterogeneous, comprising cognitive deficits, psychiatric disorders, motor and sensory impairment, epilepsy, and others (Ietswaart, Milders, Crawford, Currie, & Scott, 2008; Schwarzbald et al., 2008). Cognitive deficits, however, stand out due to its elevated prevalence and impact in daily life (Larson, Perlstein, Demery, & Stigge-Kaufman, 2006). Studies on moderate and severe TBI have found a significant impairment of cognition in up to 50% of patients (Kersel, Marsh, Havill, & Sleight, 2001; Vakil, 2005). Studies on mild TBI have shown more varied results, with cognitive changes affecting less than 1 to 20% of patients (Arciniegas, Anderson, Topkoff, & McAllister, 2005; Carroll et al., 2004). TBI can affect several domains of cognition, in particular attention, working and long-term memory, processing speed, and executive functions (Mathias & Wheaton, 2007). Although patients tend to experience some improvement with time, cognitive deficits frequently have a chronic evolution particularly after severe TBI, being present many years after trauma (Hoofien, Gilboa, Vakil, & Donovick, 2001; Ruttan, Martin, Liu, Colella, & Green, 2008). Moreover, cognitive deficits have been associated with poor psychosocial function as well as behavioral and emotional problems (Chamelian & Feinstein, 2006; Mazaux et al., 1997).

Despite its importance, the mechanisms and determinants of cognitive impairment following TBI are poorly understood. From a neuroanatomical point of view, it is reasonable to consider that damage in a specific brain region may impair its function with

regard to cognition. For example, damage to the dorsolateral prefrontal is likely to affect executive function and orbitofrontal damage decision making (Bechara, Damasio, & Damasio, 2000). However, such neuroanatomical explanations are of limited value in the case of TBI, since it typically involves damage of a diffuse nature or in areas remote to the impact (Sidaros et al., 2008). Some patients can even experience cognitive difficulties in the absence of gross neuroimaging findings (Azouvi, 2000). The eventual damage produced by trauma results not only from primary, but also from secondary injury, involving pathological mechanisms of ischemia, excitotoxicity, inflammation, oxidative stress, and others. These mechanisms reach their peak in the early phase after TBI, within hours or a day, and vary in intensity according to genetic background, clinical features and concomitant pathological conditions (Maas, Stocchetti, & Bullock, 2008). However, also long-term degenerations of gray and white matter, which continue over years have been described with modern imaging techniques (Bendlin et al., 2008) together with changes in the brain's microstructure (Sidaros et al., 2008).

Although the characterization of cognitive function following TBI has been approached by several studies (Mathias & Wheaton, 2007; Ruttan et al., 2008), much less is known regarding the role of early clinical variables in later sequelae of TBI. Most existing studies employed a retrospective design and evaluated non-consecutive samples or patients with different severity of TBI. Thus, the present study aimed to prospectively assess clinical and demographic variables in the acute phase of a consecutive sample of patients with severe TBI. In chronic phase, patients were evaluated regarding cognition through a comprehensive and well-recognized battery of neuropsychological tests. A multivariate logistic regression analysis was done to investigate the independent association between clinical, demographic, neurosurgical, laboratory and neuroradiological variables during hospitalization and the cognitive performance of patients at least one year after hospitalization due to severe TBI.

2. Materials and methods

2.1 Participants

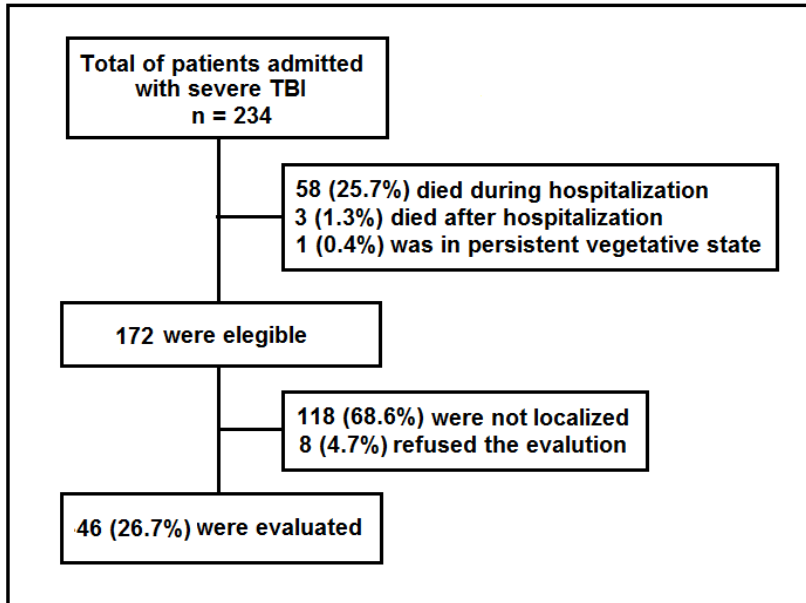
A total of 234 consecutive patients with severe TBI from the metropolitan region of Florianópolis city (southern Brazil)

admitted between February 2001 and March 2009 at the intensive care unit (ICU) of the Hospital Governador Celso Ramos were included in the acute study protocol. The Hospital is a tertiary referral center for trauma for 1 million people population of the metropolitan region of Florianópolis city. Severe TBI was defined by Glasgow Coma Scale (GCS) score 8 or lower after neurosurgical resuscitation or deterioration to this level within 48 hours following trauma. Because of the lower number of cases and different TBI mechanisms involved, victims of gunshot injury were not included in the present study. One hundred and seventy two patients (73%) survived during hospitalization. Attempts to contact all survivors were made by phone, mail and home visits in a period between 1 to 6 years after hospitalization. A total of 46 patients completed neuropsychological assessment between March 2007 and April 2010 (see Fig. 1). Control subjects matched for gender, age and education level were recruited during the same period by convenience. They were companion persons of patients from other outpatient clinics and had no previous history of neurological or psychiatric disorders.

2.2 *Demographic and clinical variables*

Variables collected during hospitalization included admission of the GCS, pupils' examination, presence of associated trauma, admission serum glucose from peripheral blood. The admission brain computed tomography (CT) scans were used to determine the Marshall classification (Marshall et al., 1992) and presence of subarachnoid hemorrhage. Demographic variables included gender, age at time of TBI, neuropsychological assessment, hand dominance and years of education at the time of neuropsychological assessment. Hospitalization data and neuropsychological evaluation were collected prospectively.

Figure 1. Sampling course for neuropsychological evaluation of adults consecutively admitted at the Intensive Care Unit (ICU) due to severe non-missile TBI.



2.3 Neuropsychological assessment

The neuropsychological battery includes: Letters and Category Fluency (Lezak, Howieson, & Loring, 2004), Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT) (Rey, 1958), Wechsler Memory Scale III (WMS-III) subtests Logical Memory First Recall (LM 1st), Logical Memory I (LM I), Logical Memory II (LM II), and Visual Reproduction I (VR I), Visual Reproduction II (VR II), Visual Reproduction Recognition (VR Rec) (Wechsler, 1997), Wechsler Adult Intelligence Scale III (WAIS-III) subtests Digit Span, Similarities, Vocabulary and Block Design (Wechsler, 2004). Neuropsychological evaluation was blinded for all the clinical, radiological, neurosurgical and laboratory variables during hospitalization.

2.4 Ethical aspects

All procedures were approved by the Human Research Ethical Committee of the Universidade Federal de Santa

Catarina. Informed consent was obtained from the patients and controls.

2.5 *Statistical analysis*

Initially we analyzed if patients who underwent the neuropsychological evaluation were comparable with the eligible patients that were not evaluated (missing cases) according to their clinical, demographic, and hospitalization variables. Categorical variables were analyzed using chi-square, continuous variables by Mann-Whitney tests. The neuropsychological performance of patients and control participants was compared by the Mann-Whitney U test to identify the cognitive domains affected by TBI.

A univariate analysis was done to investigate the association between the performances of patients on each neuropsychological test (dependent variables) and their clinical, demographic, and hospitalization variables (independent variables). The association between the neuropsychological tests and age and education (both in years) at the time point of TBI were investigated by linear regression. Normality distribution was determined the Kolmogorov-Smirnov test. The association between the demographic clinical, laboratory, neurosurgical and neuroradiological variables from the acute TBI phase and the neuropsychological tests was done by Student's "t" test or ANOVA.

The independent variables that showed an association with the neuropsychological tests (dependent variables) in the univariate analysis with a "p" level of significance lower than 0.20 were included in a linear multiple regression analysis. This analysis was done to identify the demographic, clinical, laboratory, neurosurgical and neuroradiological variables that could be considered as good predictor for each cognitive test performance later after the TBI. In this analysis the independent continuous variables were considered covariates. Categorical variables were included in the model classified as 0 or 1 (for dichotomous) and 0, 1 or 2 for those showing 3 categories. Because a previous work (Senathi-Raja, Ponsford, & Schonberger, 2010) demonstrated that after maximum spontaneous recovery from TBI, poorer cognitive functioning may be independently associated with the increased time after injury we also include in the analysis the time (in years) of cognitive

evaluation after TBI. Each neuropsychological test was the dependent variable, and the B coefficient (B), R coefficient (R) and R square (R squ) of the final model that offered the most plausible explanation for the variability of subjects' performance in the different neuropsychological tests. A "p" level lower than 0.05 was considered significant, but variables with levels lower than 0.15 were considered relevant in the final model if they showed clinical plausibility. We did not adjust for multiple tests in order to avoid a type II error (Perneger, 1998). The analysis was done by software SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

RESULTS

Patients were evaluated on average 3 (SD ± 1.8) years after hospitalization (range: 1-6 years). Eighty five percent of patients were male and their mean age was 34 (SD= ± 13) years. TBI causes were road accidents in five (10.9%), automobile accidents in nine (19.6%), falls in thirteen (28.3%), motorcycle accidents in sixteen (n=34%), and violence in 3 (6.5%). The investigated variables show a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov, $p \geq 0.10$).

There were no significant statistic differences ($p > 0.15$) between evaluated and non-evaluated patients (missing cases) for cognitive performance with respect to clinical, demographic, laboratory, radiological and neurosurgical variables (Table 1). This indicates that evaluated patients were a representative sample of the initial sample of cases according to the hospitalization variables analyzed.

Table 2 shows the demographic characteristics and cognitive performance of patients and controls. There were no statistic differences ($p \geq 0.49$) between the cognitively evaluated patients and controls according to gender, age, education level and manual dominance. TBI patients showed significantly lower performance in letter and category fluency, RAVLT (total, retention and delayed), LM (first recall, immediate and delayed), VP (immediate, delayed and recognition) and block design; they also showed a trend ($p = 0.06$) for lower performance in digit span, similarities and vocabulary.

There was no association between gender ($p > 0.24$), associated trauma ($p > 0.22$) and time of cognitive evaluation after hospitalization, expressed in months, ($p > 0.25$) and any of the cognitive tests evaluated in patients with TBI (data not

shown). The univariate analysis of association between demographic, clinical, laboratory, radiological, and neurosurgical variables and the performance in the cognitive tests with a “p” level of 0.20 or lower are shown in Tables 3a and 3b.

Table 4 shows the final models of linear multiple regression analysis that were the best predictors for explaining the demographic, clinical, radiological and neurosurgical variables independently associated with cognitive test performance of the TBI patients. Education was independently associated with better scores in all the studied scores except LM II and VP Rec. Older age remained independently associated with lower scores in all the applied tests except the vocabulary test ($p = 0.31$). Admission glucose levels of 150 mg/dl or higher were independently associated with lower scores in the RAVLT-retention test. Absence of sub-arachnoid hemorrhage at admission CT was independently associated with higher scores in the LM II. The admission CT with Marshal Class IV or worse showed a non-significant trend for association with lower performance in the vocabulary ($p = 0.08$) and LM 1st tests ($p = 0.10$).

The linear multiple logistic regression analysis models showed a moderately strong linear relationship ($60 < \text{correlation coefficient} < 0.80$) in 13 of 15 cognitive tests and a very strong one in one test (correlation coefficient = 0.80). Regression models were valid because (i) there were no outliers on the residuals, (ii) residual data points were independent, and (iii) the residual distribution was normal.

Discussion

This is one of the few prospective studies concerning the cognitive disabilities of adult consecutive patients with severe TBI controlling for demographic, clinical, neuroimaging, neurosurgical and laboratorial variables with detailed description of missing cases. Among all the controlled clinical, demographical, neurosurgical, laboratory and radiological variables of the acute hospitalization phase, old age and lower education level were the most important predictors of worse long-term cognitive impairment. These findings are in agreement with previous retrospective studies of severely impaired TBI patients (Chu et al., 2007; Sidaros et al., 2008; Vanderploeg, Curtiss, Luis, & Salazar, 2007). The regression models including education and age only (for 9 cognitive tests) or in combination with either one

or two variables (for 6 cognitive tests) showed a moderate to strong linear relationship (R coefficient = 0.60 to 0.80) with cognitive performance with 14 neuropsychological tests. The regression models were able to explain only 41 to 61% of 14 cognitive tests, indicating that other non-identified variables contribute for the remaining part of each cognitive test score. It should also be noted that compared to other samples of patients with TBI (Andriessen et al., 2011; Leitgeb et al., 2011), our sample was particularly young (15-20 years younger than in these other studies); it had, however, the same average age as the sample in the study of Sidaros et al. (2008) (34 years). Our findings also demonstrated that in our sample of patients (evaluated in mean 3 ± 1.8 years after TBI), the time elapsed after the trauma remain not included in the regression model as a independent variable associated with any evaluated cognitive test. The low occurrence of association between variables well known to be predictive of mortality or morbidity (Glasgow Outcome Scale) like admission pupils size, GCS, serum glucose, Marshal CT classification (Gullo et al., 2010; Hohl, et al ; Martins et al., 2009; Roozenbeek et al., 2011) was unexpected. This may indicate that in our sample of patients severe TBI cases, the mechanisms involved with mortality and morbidity may differ at least in part from those involved with global cognition recovery. We cannot exclude the possibility of a type II error because the sample size was in the limit for the inclusion of 3 to 4 variables in a multiple regression analysis. However, the “p” level of significance for association between these variables and almost all the analyzed cognitive tests became higher than 0.5 when they were individually included in the regression model together with age and education level (data not shown).

Missing cases in the follow up (a well known worldwide problem of TBI studies (Bombardier et al., 2010; Sigurdardottir, Andelic, Roe, & Schanke, 2009)) may raise doubts whether the analyzed sample of patients from the present work represents adequately the survivor group as a whole. It is important to recognize that a substantial number of variables during and after hospitalization were not controlled and may contribute to the cognitive prognosis. One potentially important clinical variable not evaluated in our patients was the duration of post-traumatic amnesia (PTA). The PTA has been associated as a important predictive variable of cognitive performance one year after TBI

(Brown et al., 2010).

However, because the primary end point of our study was to determine if the investigated demographic and clinical variables accessed prospectively during hospitalization were associated with long-term cognitive prognosis in severe TBI survivors we minimized the missing problem by controlling the distribution of these variables between evaluated and non-evaluated subjects. The very low level of association observed between the hospitalization variables and the cognitive performance made improbable that those variables could become significantly associated with the outcome after controlling the imbalance of any other non-investigated variable, including the PTA.

Although impaired cognitive functioning has been associated with increased time after TBI in long-term follow-ups – between 5 to 22 years in the study of [Senathi-Raja et al.\(2010\)](#) and up to 30 years in that of Himanen et al. (2006) – the significant cognitive impairment observed in our patients does not correlate with time course after TBI in a period between one to six years after injury. This may be related to differences in the number of older patients included in the Senathi-Raja et al. (2010) study in comparison to a relatively young age of our evaluated patients.

We conclude that education and age are the most important predictors of long-term cognitive disability in this Brazilian sample of (relatively young) adult patients after severe TBI. Variables commonly associated with mortality or morbidity measured by the Glasgow Outcome Scale including pupils' examination, CT Marshal Classification, GCS, serum glucose trauma, had a limited predictive value for cognitive performance of survivors' patients with severe TBI. The identification of clinical and laboratorial markers of long-term cognitive disabilities in patients with severe TBI constitutes an important challenge for the scientific community. The predictive value of methodologically rigorous research paradigms, however, is of high importance for the development of appropriate treatment strategies in patients with severe brain damage (Fraser, 2000; Markowitsch & Staniloiu; Ponsford, Harrington, Olver, & Roper, 2006).

References

Andriessen, T. M., Horn, J., Franschman, G., van der Naalt, J.,

- Haitsma, I., Jacobs, B., et al. (2011). Epidemiology, Severity Classification, and Outcome of Moderate and Severe Traumatic Brain Injury: A Prospective Multicenter Study. *J Neurotrauma*.
- Arciniegas, D. B., Anderson, C. A., Topkoff, J., & McAllister, T. W. (2005). Mild traumatic brain injury: a neuropsychiatric approach to diagnosis, evaluation, and treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 1(4), 311-327.
- Azouvi, P. (2000). Neuroimaging correlates of cognitive and functional outcome after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*, 13(6), 665-669.
- Bechara, A., Damasio, H., & Damasio, A. R. (2000). Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*, 10(3), 295-307.
- Bendlin, B. B., Ries, M. L., Lazar, M., Alexander, A. L., Dempsey, R. J., Rowley, H. A., et al. (2008). Longitudinal changes in patients with traumatic brain injury assessed with diffusion-tensor and volumetric imaging. *Neuroimage*, 42(2), 503-514.
- Bombardier, C. H., Fann, J. R., Temkin, N. R., Esselman, P. C., Barber, J., & Dikmen, S. S. (2010). Rates of major depressive disorder and clinical outcomes following traumatic brain injury. *Jama*, 303(19), 1938-1945.
- Brown, A. W., Malec, J. F., Mandrekar, J., Diehl, N. N., Dikmen, S. S., Sherer, M., et al. (2010). Predictive utility of weekly post-traumatic amnesia assessments after brain injury: A multicentre analysis. *Brain Inj*, 24(3), 472-478.
- Carroll, L. J., Cassidy, J. D., Peloso, P. M., Borg, J., von Holst, H., Holm, L., et al. (2004). Prognosis for mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *J Rehabil Med*(43 Suppl), 84-105.
- Chamelian, L., & Feinstein, A. (2006). The effect of major depression on subjective and objective cognitive deficits in mild to moderate traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 18(1), 33-38.
- Chu, B. C., Millis, S., Arango-Lasprilla, J. C., Hanks, R., Novack,

- T., & Hart, T. (2007). Measuring recovery in new learning and memory following traumatic brain injury: a mixed-effects modeling approach. *J Clin Exp Neuropsychol*, 29(6), 617-625.
- Fraser, R. T., & Clemmons, D.C. (2000). *Traumatic brain injury rehabilitation: practical, vocational, neuropsychological, and psychotherapy interventions*. Boca Raton: CRC Press.
- Gullo, J. D., Bertotti, M. M., Silva, C. C., Schwarzbald, M., Diaz, A. P., Soares, F. M., et al. (2010). Hospital Mortality of Patients with Severe Traumatic Brain Injury is Associated with Serum PTX3 Levels. *Neurocrit Care*.
- Himanan, L., Portin, R., Isoniemi, H., Helenius, H., Kurki, T., & Tenovuo, O. (2006). Longitudinal cognitive changes in traumatic brain injury: a 30-year follow-up study. *Neurology*, 66(2), 187-192.
- Hohl, A., Gullo, J.S., Silva, C.C., Bertotti, M.M., Felisberto, F., Nunes, J.C., & Walz, R. Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: a multivariate analysis. *J Crit Care, In press*.
- Hoofien, D., Gilboa, A., Vakil, E., & Donovan, P. J. (2001). Traumatic brain injury (TBI) 10-20 years later: a comprehensive outcome study of psychiatric symptomatology, cognitive abilities and psychosocial functioning. *Brain Inj*, 15(3), 189-209.
- Ietswaart, M., Milders, M., Crawford, J. R., Currie, D., & Scott, C. L. (2008). Longitudinal aspects of emotion recognition in patients with traumatic brain injury. *Neuropsychologia*, 46(1), 148-159.
- Kersel, D. A., Marsh, N. V., Havill, J. H., & Steigh, J. W. (2001). Neuropsychological functioning during the year following severe traumatic brain injury. *Brain Inj*, 15(4), 283-296.
- Larson, M. J., Perlstein, W. M., Demery, J. A., & Stigge-Kaufman, D. A. (2006). Cognitive control impairments in traumatic brain injury. *J Clin Exp Neuropsychol*, 28(6), 968-986.
- Leitgeb, J., Mauritz, W., Brazinova, A., Janciak, I., Majdan, M., Wilbacher, I., et al. (2011). Effects of Gender on Outcomes

After Traumatic Brain Injury. *J Trauma*.

Lezak, M., Howieson, D., & Loring, D. (2004). *Neuropsychological assessment*. New York: Oxford.

Maas, A. I., Stocchetti, N., & Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*, 7(8), 728-741.

Markowitsch, H. J., & Staniloiu A. Amnesia. *Lancet*, *In press*.

Marsh, N. V., & Kersel, D. A. (2006). Frequency of behavioural problems at one year following traumatic brain injury: correspondence between patient and caregiver reports. *Neuropsychol Rehabil*, 16(6), 684-694.

Marshall, L. F., Marshall, S. B., Klauber, M. R., Van Berkum Clark, M., Eisenberg, H., Jane, J. A., et al. (1992). The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma*, 9 Suppl 1, S287-292.

Martins, E. T., Linhares, M. N., Sousa, D. S., Schroeder, H. K., Meinerz, J., Rigo, L. A., et al. (2009). Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City. *J Trauma*, 67(1), 85-90.

Mathias, J. L., & Wheaton, P. (2007). Changes in attention and information-processing speed following severe traumatic brain injury: a meta-analytic review. *Neuropsychology*, 21(2), 212-223.

Mazaux, J. M., Masson, F., Levin, H. S., Alaoui, P., Maurette, P., & Barat, M. (1997). Long-term neuropsychological outcome and loss of social autonomy after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 78(12), 1316-1320.

Perneger, T. V. (1998). What's wrong with Bonferroni adjustments. *Bmj*, 316(7139), 1236-1238.

Ponsford, J., Harrington, H., Olver, J., & Roper, M. (2006). Evaluation of a community-based model of rehabilitation following traumatic brain injury. *Neuropsychol Rehabil*, 16(3), 315-328.

- Rey, A. (1958). *L'examen clinique en psychologie*. Paris: Press Universitaire de France.
- Roizenbeek, B., Lingsma, H. F., Perel, P., Edwards, P., Roberts, I., Murray, G. D., et al. (2011). The added value of ordinal analysis in clinical trials: an example in traumatic brain injury. *Crit Care*, *15*(3), R127.
- Ruttan, L., Martin, K., Liu, A., Colella, B., & Green, R. E. (2008). Long-term cognitive outcome in moderate to severe traumatic brain injury: a meta-analysis examining timed and untimed tests at 1 and 4.5 or more years after injury. *Arch Phys Med Rehabil*, *89*(12 Suppl), S69-76.
- Schwarzbold, M., Diaz, A., Martins, E. T., Rufino, A., Amante, L. N., Thais, M. E., et al. (2008). Psychiatric disorders and traumatic brain injury. *Neuropsychiatr Dis Treat*, *4*(4), 797-816.
- Senathi-Raja, D., Ponsford, J., & Schonberger, M. (2010). Impact of age on long-term cognitive function after traumatic brain injury. *Neuropsychology*, *24*(3), 336-344.
- Sidaros, A., Engberg, A. W., Sidaros, K., Liptrot, M. G., Herning, M., Petersen, P., et al. (2008). Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study. *Brain*, *131*(Pt 2), 559-572.
- Sigurdardottir, S., Andelic, N., Roe, C., & Schanke, A. K. (2009). Cognitive recovery and predictors of functional outcome 1 year after traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc*, *15*(5), 740-750.
- Vakil, E. (2005). The effect of moderate to severe traumatic brain injury (TBI) on different aspects of memory: a selective review. *J Clin Exp Neuropsychol*, *27*(8), 977-1021.
- Vanderploeg, R. D., Curtiss, G., Luis, C. A., & Salazar, A. M. (2007). Long-term morbidities following self-reported mild traumatic brain injury. *J Clin Exp Neuropsychol*, *29*(6), 585-598.
- Wechsler, D. (1997). *Wechsler Memory Scale, WMS-III*. San Antonio: The Psychological Corporation.

Wechsler, D. (2004). *WAIS-III: Manual para administração e avaliação*. São Paulo: Casa do Psicólogo.

Table 1. Clinical, demographic, laboratory, radiological and neurosurgical variables.

Variables	All Patients N = 172 (%)	Cognitive Examination		p value
		None-evaluated n = 126 (73.3%)	Evaluated n = 46 (26.7%)	
Sex				
Male	147(85.5%)	108 (85.7)	39 (84.8)	1.0
Female	25(14.5%)	18 (14.3)	07 (15.2)	
Age (years)				
Mean (± SD)	34.44 (16.6)	34.5 (17.7)	34.1 (13.6)	0.89
Glucose^a				
Mean (± SD)	155.9 (60.41)	155.6 (56.8)	156.6 (70.1)	0.93
Marshall CT classification^b				
Type I injury	7(4.1)	5 (4.0)	2 (4.3)	0.90
Type II injury	41(23.8)	31 (24.6)	10 (21.7)	
Type III injury	44(25.6)	32 (25.4)	12 (26.1)	
Type IV injury	12(7.0)	8 (6.3)	4 (8.7)	
Evacuated mass lesion	44(25.6)	31 (24.6)	13 (28.3)	
Nonevacuated lesion	16(9.3)	12 (9.5)	4 (8.7)	
SAH^c				
No	97(56.4)	76 (60.3)	21 (45.7)	0.15
Yes	71(41.3)	48 (38.1)	23 (50.0)	
Associated trauma				
Yes	106(61.6))	76 (60.3)	30 (65.2)	0.59
No	66(38.4)	50 (39.7)	16 (34.8)	
Associated trauma type				
Spine				
Yes	14(8.1)	12 (9.5)	2 (4.3)	0.35
No	156(91.9)	114 (90.5)	44 (95.7)	
Thorax				
Yes	42(24.4)	31 (24.6)	11 (23.9)	1.0
No	130(75.6)	95 (75.4)	35 (76.1)	
Abdominal				
No	163(94.8)	119 (94.4)	44 (95.7)	1.0
Yes	9(5.2)	7 (5.6)	2 (4.3)	
Limbs				
Yes	53(30.8)	40 (31.7)	13 (28.3)	0.71
No	119(69.2)	86 (68.3)	33 (71.7)	
Glasgow Coma Scale^d				
7 or 8	77(44.8)	55 (43.7)	22 (47.8)	0.42
5 or 6	50(29.1)	40 (31.7)	10 (21.7)	
3 or 4	45(26.2)	31 (24.6)	14 (30.4)	
Pupils^e				
Isocorics	106(61.6)	81 (64.3)	25 (54.3)	0.38
Anisocorics	58(33.7)	39 (31.0)	19 (41.3)	
Midriatics	6(3.5)	5 (4.0)	1 (2.2)	

a Glucose were not measured in the admission in 11 patients; b Tomographic Marshall scale were not evaluated in 4 patients. c SAH = Subarachnoid hemorrhage was not confirmed in 4 patients; d One patient was not evaluated adequately Glasgow Coma Scale. e Two patients had ocular trauma and pupils were not adequately evaluated.

Table 2. Characteristics and neuropsychological evaluation of controls and patients with severe TBI

Variables	Groups		"p" Value
	Patients n = 46 (66.7%)	Controls n = 23 (33.3%)	
GENDER			
Male/ Female	39 (84.8) / 7 (15.2)	18 (78.3) / 5 (21.7)	0.51
Age in years, Mean (\pm SD)	34.1 (13.6)	35.9 (12.3)	0.61
Education in years, Mean (\pm SD)	9.0 (4.7)	9.6 (4.5)	0.49
Hand dominance			
Right	38 (88.4)	22 (95.7)	
Left or both	05 (11.6)	01 (4.3)	0.65
Cognitive Tests			
Letters Fluency	(n = 41)	(n = 22)	
Mean (SD)	19.7 (15.8)	28.3 (8.6)	0.001
Category Fluency	(n = 44)	(n=23)	
Mean (SD)	9.9 (5.3)	15.3 (4.3)	0.001
RAVLT	(n=44)	(n = 23)	
Total, Mean (SD)	31.1 (13.6)	45.0 (10.3)	< 0.001
Retention, Mean (SD)	4.9 (3.6)	8.9 (2.9)	< 0.001
Delayed, Mean (SD)	4.7 (3.6)	9.4 (2.9)	< 0.001
WMS – III			
Logical Memory, First Recall	(n = 42)	(n = 23)	
Mean (SD)	16.4 (8.9)	21.5 (7.2)	0.02
Logical Memory I	(n = 42)	(n = 23)	
Mean (SD)	26.5 (13.6)	35.5 (9.9)	< 0.01
Logical Memory II	(n=42)	(n=23)	
Mean (SD)	12.7 (10.5)	21.2 (8.5)	0.001
Visual Reproduction I	(n=45)	(n = 23)	
Mean (SD)	57.5 (28.0)	78.4 (19.0)	0.002
Visual Reproduction II	(n = 45)	(n = 23)	
Mean (SD)	33.0 (24.3)	61.5 (22.6)	< 0.0001
Visual Reproduction, Recognition	(n = 42)	(n = 23)	
Mean (SD)	38.9 (8.1)	42.5 (3.3)	0.001
WAIS – III			
Digit Span	(n=45)	(n=23)	
Mean (SD)	10.9 (4.7)	13.0 (3.9)	0.06
Similarities	(n = 41)	(n = 23)	
Mean (SD)	16.8(7.9)	20.5 (7.8)	0.06
Vocabulary	(n = 44)	(n = 23)	
Mean (SD)	25.6 (14.0)	31.4 (9.9)	0.06
Block Design	(n = 45)	(n = 23)	
Mean (SD)	26.7 (13.7)	34.3 (12.4)	0.03

Table 3a. Association between demographic, clinical, laboratory, radiological, and neurosurgical variables and language and WAIS-III tests performance of TBI patients

Variables	Letters Fluency	Category Fluency	Digit Span	Similarities	Vocabulary	Block Design
Education^a	B = 1.22 R = 0.59 R squ = 0.35 p < 0.0001^a	B = 0.57 R = 0.51 R squ = 0.27 p < 0.001	B = 0.52 R = 0.54 R squ = 0.30 p < 0.0001	B = 1.25 R = 0.75 R squ = 0.56 p < 0.0001	B = 1.95 R = 0.68 R squ = 0.44 p < 0.0001	B = 1.25 R = 0.44 R squ = 0.19 p = 0.003
Age (years)^a	B = - 0.27 R = 0.37 R squ = 0.14 p = 0.02^a	B = - 0.20 R = 0.53 R squ = 0.28 p < 0.001	B = - 0.12 R = 0.35 R squ = 0.35 p = 0.02	B = - 0.18 R = 0.30 R squ = 0.09 p = 0.06	B = - 0.16 R = 0.16 R squ = 0.02 p = 0.31	B = - 0.55 R = 0.55 R square = 0.31 p < 0.0001
Glucose^b	Mean (SD) 60-150 mg/dl > 150 mg/dl p = 0.55^b	Mean (SD) 10.2 (5.2) 8.8 (5.2) p = 0.41	Mean (SD) 11.0 (4.3) 10.4 (5.4) p = 0.68	Mean (SD) 16.6 (8.0) 18.1 (8.3) p = 0.60	Mean (SD) 25.7 (13.0) 25.7 (16.4) p = 1.0	Mean (SD) 28.3 (13.1) 24.5 (15.5) p = 0.41
Admission CT (Marshall)^{b,c}	Mean (SD) I to III (n = 24) ≥ IV (n = 21) p = 0.20^b	Mean (SD) 11.5 (4.3) 8.1 (5.8) p = 0.03	Mean (SD) 12.5 (4.1) 9.2 (4.7) p = 0.02	Mean (SD) 18.5 (6.5) 15.1 (9.2) p = 0.18	Mean (SD) 30.7 (12.1) 20.0 (14.0) p = 0.01	Mean (SD) 32.0 (11.5) 21.2 (13.9) p = 0.007
SAH on admission CT^{d,e}	Mean (SD) No (n = 21) Yes (n = 23) p = 0.28^b	Mean (SD) 5.2 (1.1) 5.1 (1.1) p = 0.87	Mean (SD) 10.8 (4.4) 10.9 (4.9) p = 0.94	Mean (SD) 17.6 (7.1) 15.6 (7.2) p = 0.39	Mean (SD) 28.2 (14.0) 22.7 (12.7) p = 0.19	Mean (SD) 30.4 (12.8) 21.1 (13.8) p = 0.08
Coma Glasgow Scale^f	Mean (SD) 7 or 8 5 or 6 3 or 4 p = 0.20^c	Mean (SD) 11.1 (5.0) 9.4 (3.9) 8.2 (6.2) p = 0.27	Mean (SD) 12.1 (4.9) 10.3 (4.3) 9.2 (4.3) p = 0.20	Mean (SD) 19.0 (8.1) 14.4 (4.8) 14.9 (9.1) p = 0.24	Mean (SD) 28.1 (15.2) 24.7 (10.1) 21.8 (14.3) p = 0.44	Mean (SD) 30.1 (12.5) 26.7 (13.8) 21.8 (14.6) p = 0.21
Admission Pupils^g	Mean (SD) Isocoric (n = 25) Abnormal (n = 20) ^g p = 0.47^b	Mean (SD) 10.8 (4.7) 8.9 (5.9) p = 0.26	Mean (SD) 11.6 (5.0) 10.0 (4.4) p = 0.26	Mean (SD) 17.2 (8.7) 16.5 (7.2) p = 0.79	Mean (SD) 28.0 (14.9) 22.5 (13.0) p = 0.21	Mean (SD) 29.8 (14.0) 23.6 (12.5) p = 0.14

^a Association between continue variables and cognitive test evaluated by univariate linear regression; ^b Association between categorical variables and cognitive test evaluated by Student "t"; ^c Association between categorical variables and cognitive test evaluated by one-way ANOVA; ^d Among patients with abnormal pupils at admission 19 were anisocoric and 1 was midriatic. Pupils were not examined in 1 patient with ocular trauma; ^e CT results were not evaluable in 1 case; ^f Presence of subarachnoid hemorrhage (SAH) assessable in 2 cases. B = Non-standardized B coefficient of the Linear Regression; R = Pearson's coefficient; R squ = R square coefficient.

Table 3b. Association between demographic, clinical, laboratory, radiological, and neurosurgical variables and memory test performance of TBI patients

Variables	RAVLT Total	RAVLT Delayed	RV I	V II	RV Rec	LM I ^a *	LM I	LM II
Education^a	B = 1.34 R = 0.47 R squ = 0.22 p < 0.0001	B = 0.24 R = 0.31 R squ = 0.10 p = 0.03	B = 2.39 R = 0.41 R squ = 0.16 p < 0.0001	B = 1.37 R = 0.27 R squ = 0.07 p = 0.008	B = 0.17 R = 0.10 R squ = 0.10 p < 0.0001	B = 0.78 R = 0.41 R squ = 0.17 p = 0.002	B = 1.19 R = 0.41 R squ = 0.17 p = 0.001	B = 1.05 R = 0.47 R squ = 0.22 p = 0.36
Age (years)	B = -0.58 R = 0.58 R squ = 0.34 p < 0.0001	B = -0.15 R = 0.58 R squ = 0.34 p < 0.0001	B = -1.14 R = 0.56 R squ = 0.32 p < 0.0001	B = -1.01 R = 0.57 R squ = 0.33 p < 0.0001	B = -0.23 R = 0.40 R squ = 0.16 p = 0.0001	B = -0.34 R = 0.52 R squ = 0.34 p < 0.0001	B = -0.53 R = 0.54 R squ = 0.29 p < 0.0001	B = -0.47 R = 0.61 R squ = 0.37 p < 0.0001
Glucose	Mean (SD) 60-150 mg/dl 32.5 (11.8) > 150 mg/dl 27.9 (14.7) p = 0.28	Mean (SD) 4.8 (3.4) 4.1 (3.7) p = 0.54	Mean (SD) 60.1 (22.5) 50.4 (35.4) p = 0.25	Mean (SD) 35.5 (21.4) 27.8 (28.8) p = 0.33	Mean (SD) 39.3 (9.5) 38.7 (5.0) p = 0.84	Mean (SD) 16.7 (7.9) 15.6 (11.5) p = 0.74	Mean (SD) 27.2 (21.1) 15.1 (17.4) p = 0.67	Mean (SD) 12.9 (9.7) 11.9 (12.9) p = 0.80
Admission CT (Marshall)^a	Mean (SD) I to III (n = 24) 37.8 (9.9) IV or higher (n = 21) 23.7 (12.9) p < 0.0001	Mean (SD) 5.9 (3.3) 3.3 (3.5) p = 0.02	Mean (SD) 66.6 (24.3) 49.7 (29.6) p = 0.01	Mean (SD) 41.6 (24.1) 24.0 (21.3) p = 0.01	Mean (SD) 41.1 (9.7) 36.8 (5.9) p = 0.09	Mean (SD) 19.8 (7.7) 11.9 (8.7) p = 0.004	Mean (SD) 31.7 (11.9) 19.8 (13.2) p = 0.004	Mean (SD) 16.0 (9.3) 8.4 (11.0) p = 0.02
SAH on admission CT^a	Mean (SD) No (n = 21) 33.1 (12.8) Yes (n = 23) 30.1 (13.9) p = 0.47	Mean (SD) 5.1 (3.4) 4.5 (3.9) p = 0.57	Mean (SD) 62.6 (27.8) 53.2 (27.6) p = 0.27	Mean (SD) 36.4 (24.8) 31.1 (24.6) p = 0.48	Mean (SD) 40.1 (9.7) 38.4 (6.3) p = 0.53	Mean (SD) 19.0 (7.5) 13.6 (9.1) p = 0.05	Mean (SD) 30.3 (11.8) 21.5 (13.8) p = 0.06	Mean (SD) 15.5 (9.1) 9.5 (10.8) p = 0.07
Glasgow Coma Scale	Mean (SD) 7 or 8 33.2 (13.3) 5 or 6 30.8 (10.2) 3 or 4 17.5 (16.1) p = 0.50	Mean (SD) 5.8 (3.6) 3.9 (3.3) 3.2 (3.4) p = 0.09	Mean (SD) 65.4 (24.1) 53.4 (33.0) 48.6 (28.4) p = 0.20	Mean (SD) 38.3 (23.6) 35.4 (29.0) 23.4 (20.1) p = 0.20	Mean (SD) 40.3 (4.5) 36.4 (6.8) 38.9 (12.0) p = 0.52	Mean (SD) 17.7 (8.3) 15.3 (10.5) 15.8 (9.1) p = 0.62	Mean (SD) 28.9 (12.4) 24.6 (15.9) 23.8 (14.3) p = 0.53	Mean (SD) 14.6 (10.0) 13.0 (10.9) 8.8 (11.0) p = 0.32
Admission Pupils^b	Mean (SD) Isocories (n = 25) 33.2 (12.7) Abnormal (n = 20) ^d 29.6 (14.7) p = 0.31	Mean (SD) 5.3 (3.5) 4.2 (3.7) p = 0.33	Mean (SD) 60.6 (27.9) 55.3 (28.1) p = 0.54	Mean (SD) 38.6 (24.5) 26.7 (21.6) p = 0.11	Mean (SD) 38.2 (6.5) 40.5 (10.1) p = 0.37	Mean (SD) 17.3 (9.7) 15.2 (8.0) p = 0.48	Mean (SD) 27.9 (15.0) 24.7 (12.0) p = 0.47	Mean (SD) 14.1 (10.2) 11.2 (10.8) p = 0.37

^a Association between continue variables and cognitive test evaluated by univariate linear regression; ^b Association between categorical variables and cognitive test evaluated by Student "t"; ^c Association between categorical variables and cognitive test evaluated by one-way ANOVA; ^d Among patients with abnormal pupils at admission 19 were anisocoric and 1 was midriatic. Pupils were not examined in 1 patient with ocular trauma; ^e CT results were not evaluate in 1 case; ^f Presence of subarachnoid hemorrhage (SAH) assessable in 2 cases. B = Non-standardized B coefficient of the Linear Regression; R = Pearson's coefficient; R squ = R square coefficient.

Table 4. Linear multiple logistic regression analysis that best explain the independent association between the performance in the cognitive tests and clinical, demographic, radiologic and neurosurgical variables of survivors patients with severe TBI.

COGNITIVE TESTS AND INDEPENDENT VARIABLES	Constant	R coefficient	R square	B coefficient	"p" level
Letter Fluency					
Age (years)	14.2	0.67	0.45	- 0.23	0.01
Education				1.16	< 0.0001
Category Fluency					
Age (years)	11.5	0.71	0.50	- 0.20	< 0.0001
Education				0.52	< 0.0001
Digit Span					
Age (years)	9.8	0.61	0.37	- 0.10	0.03
Education				0.49	< 0.0001
Similarities					
Age (years)	10.2	0.80	0.61	- 0.13	0.04
Education				1.20	< 0.0001
Vocabulary					
Education	13.1	0.69	0.47	1.72	< 0.0001
Marshal CT Class \geq 4				- 6.07	0.08
Block Design					
Age (years)	34.3	0.67	0.45	- 0.50	< 0.0001
Education				1.10	0.02
RAVLT-Total					
Age (years)	38.4	0.71	0.51	- 0.54	< 0.0001
Education				1.20	< 0.0001
RAVLT- Retention					
Age (years)	7.1	0.63	0.40	- 0.11	0.001
Education (years)				0.23	0.01
Admission Glucose \geq 150 mg/dl				- 1.92	0.04
RAVLT- Delayed					
Age (years)	7.8	0.64	0.41	- 0.15	0.04
Education (years)				0.20	< 0.0001
VPI					
Age (years)	75.6	0.66	0.43	-1.10	< 0.0001
Education (years)				2.02	0.005
VP II					
Age (years)	56.7	0.61	0.37	- 0.97	< 0.0001
Education (years)				1.04	0.11
VP Rec					
Age (years)	47.1	0.40	0.16	- 0.23	0.008
LM 1*					
Age (years)	21.6	0.65	0.43	- 0.26	0.004
Education (years)				0.58	0.02
Marshal CT Class \geq IV				- 4.06	0.10
LM I					
Age (years)	33.6	0.64	0.41	- 0.49	< 0.0001
Education (years)				1.02	0.007
LM II					
Age (years)	19.8	0.69	0.47	- 0.46	< 0.0001
Admission CT without SAH				5.37	0.03

ANEXO 2

Submetido para: CNS Neuroscience & Therapeutics
(IF entre 3.492)

Plasma levels of oxidative stress biomarkers and long-term cognitive performance after severe head injury

Maria Emília Rodrigues de Oliveira Thais¹, Gisele Cavallazzi¹, Marcelo Liborio Schwarzbald¹, Alexandre Paim Diaz¹, Cristiane Ritter², Fabrícia Petronilho², Alexandre Hohl¹, Rui D. S. Prediger^{1,3}, Marcelo Neves Linhares^{1,4,5}, Felipe Dal Pizzol², Roger Walz^{1,6}

1. Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.
2. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;
3. Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, Departamento de Farmacologia, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.
4. Serviço de Neurocirurgia, Hospital Governador Celso Ramos (HGCR), Florianópolis, SC, Brazil.
5. Departamento de Cirurgia, Hospital Universitário, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.
6. Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

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

Conflict of Interest: The authors declare that we have no conflicts of interest in the authorship or publication of this contribution.

Introduction: Blood levels of oxidative stress biomarkers are enhanced after severe traumatic brain injury (TBI) but their association with long-term cognitive prognosis is unknown.

Objectives: To investigate the association between plasma levels of lipid peroxidation (Thiobarbituric Acid Reactive Species, TBARS) and protein oxidation (Carbonyl Groups) and cognitive performance after the severe TBI.

Methods: Fifteen cognitive tests evaluated in mean 16 (\pm 5) months after severe TBI in 22 survivor patients (mean age of 34.8 years and 86% male) with severe TBI (admission Glasgow Coma Scale, GCS \leq 8) and compared with 23 age and sex-matched controls. Plasma levels of TBARS and Carbonyl determined in patients in a median of 11 (IQ 6.5–19), 30 (IQ 24–37) and 70 (IQ 55–78) hours after TBI were correlated with their cognitive tests performances.

Results: TBI were associated with a time-dependent enhancement in plasma levels of TBARS and carbonyl. TBI patients showed a significant cognitive impairment in 13 of 15 evaluated cognitive tests. Plasma levels TBARS and Carbonil does not correlated with the cognitive performance.

Conclusions: The enhancement of plasma levels of TBARS and carbonyl after the severe TBI does not correlates with the long-term cognitive prognosis after hospitalization.

Key words: Traumatic brain injury; prognosis; TBARS; carbonyl; oxidative stress; hospital mortality.

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of morbidity and mortality of young people worldwide (1-5). TBI patients frequently suffer from long-term sequelae which have personal, familiar, and social impact (6). These sequelae are highly heterogeneous, comprising cognitive deficits, psychiatric disorders, motor and sensory impairment, epilepsy, and others (4, 7). Cognitive deficits, however, stand out due to its elevated prevalence and impact in daily life (8). Despite its importance, the mechanisms and determinants of cognitive impairment following TBI are poorly understood. From a neuroanatomical point of view, it is reasonable to consider that damage in a specific brain side or

region may impair its function with regard to cognition. For example, damage to the left temporal lobe is likely to affect verbal declarative memory. However, neuroanatomical explanations for cognitive difficulties may have limited value in the severe TBI because of diffuse and remote damage (9) even in the absence of gross neuroimaging findings (10). The eventual damage produced by trauma results not only from primary, but also from secondary injury, involving pathological mechanisms of ischemia, excitotoxicity, inflammation, oxidative stress, and others. These mechanisms reach their peak in the early phase after TBI, within hours or a day, and vary in intensity according to genetic background, clinical features and concomitant pathological conditions (11).

After the primary injury related to the trauma itself (contusions, lacerations, hemorrhage), lesions may be aggravated at pre-hospital level or after hospital admission due to hemodynamic imbalance, intracranial hypertension, anemia, infections, fever, hypoxia, seizures, metabolic and electrolytic imbalance. An excessive amount of reactive oxygen species (ROS), generated by several combined mechanisms, including neutrophils activation, endothelial cells, nerve and glial cells, iron ions (from hemoglobin degradation in the hemorrhagic areas) and brain reperfusion (12-15) has been implicated in brain lesion in TBI.

The ROS reaction with proteins, deoxyribonucleic acids (DNA) and lipids, leading to the oxidative damage of cells and tissues in TBI, has been discussed for more than twenty years (12, 16-17). Experimental models of TBI in rodents demonstrated that the damage caused by the oxidative stress might vary according to the brain structures, trauma intensity and time after injury (18). The role of ROS brain damage in human TBI has been studied, however the association between its plasma markers and the prognosis in humans remains controversial (19-22).

Statistical models, which combine two or more variables of patient's data to predict clinical outcome - also called prognostic models, have been applied in TBI research (3, 5). The investigation of variables associated with prognosis may help in medical decisions as well as in identifying possible therapeutic targets for the patients. The association between oxidative stress markers and the prognosis of human TBI may be affected by

several confounding biases in the context of critically ill patients with TBI. The multiple logistic regression analysis is useful to reduce the possibility of confounding bias leading to spurious associations between the studied variables and prognosis.

Recently we demonstrated that thiobarbituric acid reactive species (TBARS, an index of lipid peroxidation) and carbonil groups (an index of oxidative o proteins) enhanced in the plasma of patients up to 3 days after severe TBI but are not independently associated with hospital mortality of patients. Here we investigate the association between plasma levels of TABARS and carbonyl measured after the severe TBI and the long-term cognitive performance of patients.

SUBJECTS AND METHODS

Patients:

All participants were recruited from the Governador Celso Ramos Hospital, a level-1 trauma center assisting a population of approximately one million inhabitants of the metropolitan area of Florianópolis, (southern Brazil) from May 2006 until September 2009. During the study period, seventy-nine consecutive patients living in the Florianópolis metropolitan region were admitted to the intensive care unit (ICU) with severe TBI. Twenty-nine patients died during hospitalization. Among the 51 eligible survivors patients, 22 (43.1%) completed the cognitive assessment (see Figure 1). The protocol study was approved by Human Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Written informed consent was obtained from relatives (during hospitalization) and patients (chronic period). The inclusion criteria were as follows: a) severe TBI defined by Glasgow Coma Scale (GCS) score 8 or lower in the admission; b) 18 years of age or older at time of injury; c) resident of the Florianópolis metropolitan area. Victims of gunshot injuries were not included in the study.

Blood sample collection and oxidative stress parameters analyzed

Oxidative stress parameters were determined in blood plasma on the first, second and third day after TBI. The blood sample was collected the first day (median 11 hours after TBI, interquartile range of 6.5 to 19.0), second day (median 30 hours

after TBI, interquartile range of 24 to 37) and third day (median 70 hours after TBI, interquartile range of 25 to– 75). The time for blood sampling was calculated from the time of injury onwards. The time span between TBI and blood sampling was determined by one of our researchers. Five milliliters of peripheral venous blood were collected and centrifuged. The plasma was stored for 24h at -20 °C and then at -70 °C until biochemical analysis.

As an index of lipid peroxidation, the development of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was measured as previously described (18, 23-25). Briefly, the samples were analyzed by absorbance at 535 nm and results were expressed as malondialdehyde-equivalents (nm/mg protein). TBARS plasma levels were expressed in nmol/mg protein $\times 10^{-5}$. The oxidative damage to proteins was assessed by determining carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine as previously described (18, 23-25). Briefly, proteins were precipitated, dissolved in dinitrophenylhydrazine and absorbance was read at 370 nm. Plasma levels of carbonyl groups were expressed in nmol/mg protein $\times 10^{-14}$. Plasma TBARS and carbonil levels were expressed in median and interquartile range (IQ 25 – 75). The analysis of oxidative stress parameters was carried out by researchers blinded for all the clinical, demographical, neurosurgical, neuroradiological and hemodynamic variables of patients. For comparison, TBARS and carbonyl measurements were done in 10 healthy controls matched for age and sex. The control group included healthy voluntary people from the hospital and laboratory staff.

Demographic, clinical, neurosurgical, radiological, and laboratory parameters:

Demographic, clinical, neurosurgical, radiological, and laboratory data were obtained prospectively in the emergency room and during admission to the intensive care unit (ICU), following the research protocols developed by Martins et al. 2009, Gullo et al. 2010 and Hohl et al. 2011 (3, 26-27), and included: gender, age, Glasgow Coma Scale (GCS) score, pupillary status, computed tomography (CT) scan according to Marshall's classification (28), presence of subarachnoid hemorrhage (SAH) in the CT, presence of associated trauma (spine, thorax, abdomen, or limbs). Marshall CT classification differentiates TBI by four types of diffuse injuries and two types of focal injuries

according to neuroradiological findings of CT. The classification is as follows: type I, diffuse injury with no visible pathology; type II, diffuse injury with present cisterns, midline centered; type III, diffuse injury and swelling; type IV, diffuse injury and shift; type V, evacuated mass lesion; and type VI, non-evacuated mass lesion. The clinical and hemodynamic parameters, evaluated at the time of the first blood sampling collection, were blood pressure, heart rate, respiratory rate, positive end-expiratory pressure. The laboratorial variables, analyzed on the same sample as for TBARS and carbonyl measurements, were arterial blood gas, sodium, potassium, urea, creatinine, hematocrit, hemoglobin, leukocytes, and platelets.

Cognitive tests:

Cognitive evaluations were performed an average of 17.3 ± 5 (SD) months after TBI between June 2008 and September 2010. The neuropsychological battery includes: Letters and Category Fluency (29), Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT) (30), Wechsler Memory Scale III (WMS-III) subtests Logical Memory First Recall (LM 1st), Logical Memory I (LM I), Logical Memory II (LM II), and Visual Reproduction I (VR I), Visual Reproduction II (VR II), Visual Reproduction Recognition (VR Rec) (31), Wechsler Adult Intelligence Scale III (WAIS-III) subtests Digit Span, Similarities, Vocabulary and Block Design (32). Neuropsychological evaluation was blinded for all the clinical, radiological, neurosurgical and laboratory variables during hospitalization.

For comparison, control subjects ($n = 23$) matched for gender, age and education level were recruited during the same period by convenience. They were companion persons of patients from other outpatient clinics and had no previous history of neurological or psychiatric disorders.

Statistical Analysis

Initially we analyzed if patients who underwent the neuropsychological evaluation ($n = 22$) were comparable with the eligible patients that were not evaluated ($n = 29$, missing cases) according to their clinical, demographic, laboratorial (including TABRS and Carbonyl levels) and hospitalization variables. Categorical variables were analyzed using chi-square or Fisher exact test and continuous variables by Mann-Whitney tests.

The neuropsychological performance of patients and controls was compared by the Mann-Whitney U test to identify the cognitive domains affected by TBI.

The plasmatic levels of TBARS e Carbonil were determined in median 11 (n = 22), 30 (n = 21) and 70 hours (n = 19) after the severe TBI and compared with 10 controls matched for age and sex (n = 10) by Mann-Whitney U test. Comparisons of TBARS and carbonil levels among different times after TBI were done by Wilcoxon test. The “p” level of 0.05 or lower were considered statistically significant.

Finally, the correlation between the cognitive scores of each cognitive test and the serum levels of TBARS and Carbonyl measured in the first, second and third collected blood sample were determined by Spearman correlation test. When necessary a multiple logistic linear regression analysis was done adjusting for age and education level (see results).

RESULTS

The table 1 shows the comparison between patients who underwent or not the cognitive evaluation after hospitalization according to clinical, demographic, radiologic, laboratorial and neurosurgical variables. The mean age was 33.5 (\pm 14) years and 88.2% were male. There were no significant differences between evaluated (n = 22) and non-evaluated (n = 29) patients according to the analyzed variables ($p \geq 0.26$). The evaluated and non-evaluated patients also showed no differences in TBARS ($p \geq 0.12$) and Carbonyl ($p \geq 0.33$) levels evaluated in the first, second and third day after the severe TBI.

The clinical, demographic, sociocultural characteristics and cognitive performance of patients and controls are showed in the table 2. There were no differences between patients and controls according to gender, age, education level and hand dominance ($p \geq 0.35$). However, patients showed a significant lower scores in Letters and Category Fluency, RAVLT (total, retention and delayed), LM 1st, LM I, LM II, VR I, VR II, Vocabulary and Block Design. Patients also showed a trend for lower performance in Digit Span ($p = 0,08$) and similarities ($p = 0.06$). Patients and controls showed similar performance in the VR Rec test.

Figure 3A and B shows the plasmatic levels of TBARS and Carbonil of controls and patients (first, second and third blood samples). There was a time-dependent enhancement in the

serum levels of TBARS and Carbonyl after the severe TBI.

The table 4 shows the correlation between plasma levels of TBARS and Carbonyl at different times after TBI and the scores in different cognitive tests applied at least one year after hospitalization. Among the 15 evaluated cognitive tests only the vocabulary test showed a significant correlation (Spearman coefficient 0.50 e $p = 0.04$) with an oxidative stress biomarker (see table 4, TBARS levels in the third collected blood sample). This result remains not significant after the correction for age and education level imbalance ($p = 0.23$, data not shown).

DISCUSSION

To our knowledge this is the first report instance about investigation of biomarkers in long-term TBI patents prognosis evaluated with a sensible evaluation method through wide neuropsychologic assessment. Our results demonstrated that enhancement in the plasma levels of TBARS and carbonyl occurring in patients during the acute phase of severe TBI does not correlate with their long-term cognitive performance. Taken together with previous data (27) showing no association between these biomarkers and the hospital mortality, our findings suggests that measurement of plasma TABAERS and carbonyl are not useful to predict the mortality and morbidity after severe TBI.

Our findings were unexpected because brain is particularly vulnerable to oxidative stress because of its higher rate of oxygen consumption, higher level of transition metals, and polyunsaturated fatty acids. The oxidative stress pathways may be activated by excitatory mechanisms as well as several secondary mechanisms including reperfusion, and iron in its reduced state resulting from hemoglobin degradation (Fenton reaction) (27). The oxidative damage contributes to mitochondrial dysfunction leading to energy failure. This could trigger a complex cascade of cellular events, such as cellular depolarization and Ca^{+2} influx leading to excitotoxic and apoptotic neuronal death (27, 33).

Missing cases in the follow up (a well known worldwide problem of TBI studies (34-35) may raise doubts whether the analyzed sample of patients from the present work represents adequately the survivor group as a whole. We minimized the missing problem by controlling the distribution of several demographic, clinical, radiological, neurosurgical and laboratorial

variables between the evaluated and non-evaluated subjects. It is also important to recognize that a substantial number of variables during and after hospitalization were not controlled and may contribute to the cognitive prognosis. One potentially important clinical variable not evaluated in our patients was the duration of post-traumatic amnesia (PTA). The PTA has been associated as an important predictive variable of cognitive performance one year after TBI (36).

However, the very low correlation observed between the plasma biomarkers and almost all the investigated cognitive tests suggests this lack of correlation probably could not be attributed only to imbalances in non-controlled variables after hospitalization between evaluated and missing cases. In addition, because the primary end point of our study was to determine if the investigated demographic and clinical variables assessed prospectively during hospitalization were independently associated with long-term cognitive prognosis in severe TBI survivors we minimized the missing problem by controlling the distribution of these variables between evaluated and non-evaluated subjects. The very low level of association observed between the hospitalization variables and the cognitive performance made improbable that those variables could become significantly associated with the outcome after controlling the imbalance of any other non-investigated variable, including the PTA.

Concerning the technique which mainly measures MDA is not specific for free radical-induced lipid peroxidation. The MDA may also be produced during enzymatic lipid peroxidation like during the arachidonic acid cascade as a product of prostaglandin synthesis. Thus, the TBARS data is partly a measure of free radical-induced peroxidation as well as an elevation in prostaglandin synthesis which is also involved in the pathophysiology of TBI. Furthermore, MDA and other lipid peroxidation-derived aldehyde breakdown products (e.g. 4HNE and acrolein) are heavily protein bound and once they are bound will not react with thiobarbituric acid. Thus, the TBARS assay only picks up the un-bound MDA which is the minor portion of the total amount. The wide range of TBARS and carbonyl levels in the patient group may lead to a reduced power of the study, and may also be a limitation for the use of these biomarkers.

Our findings indicate that, although patients with TBI had a

progressive increase in the level of plasma markers for oxidative stress damage at the first three days after the injury, this is probably not a determinant of their long-term cognitive prognosis.

Some recent studies have demonstrated that excitatory amino acids, which are involved in the core mechanisms of neuronal injury due to excitotoxicity, also trigger neuroprotective signals against oxidative stress (37). If neuroprotective pathways are activated proportionally to the level of injury, which in turn is associated with plasma TBARS and carbonyl levels, then the mortality of patients with higher levels of those biomarkers may be the same as of patients with lower levels. We replicated ours (7) and other previous studies (38) showing that higher levels of serum glucose 12 hours after the TBI, lower GCS and abnormal pupils at admission (7, 38-39) remain independently associated with death. In the present study, there was no association between CT, SAH and death as previously demonstrated in our population. This is probably due to the small sample size of the present study. The same hypothesis may explain the trend for higher mortality in patients admitted with anisocoric pupils as compared to those having isocoric ones. Injury severity score (or any other score such as TRISS or RTS) has been demonstrated in other studies to be correlated with mortality and may be a better outcome predictor than associated trauma alone. This variable will be included in further studies.

In conclusion, the increase in plasma TBARS and protein carbonyl levels seen in the first 70 hours after severe TBI does not correlate with the cognitive prognosis. The investigation of other biomarkers for and long-term prognosis including fine motor abilities and cognitive remains a important scientific challenge in the TBI research field.

References

1. Marshall LF, Toole BM, Bowers SA. The National Traumatic Coma Data Bank. Part 2: Patients who talk and deteriorate: implications for treatment. *J Neurosurg.* 1983 Aug;59(2):285-8.
2. Marshall LF, Becker DP, Bowers SA, Cayard C,

Eisenberg H, Gross CR, et al. The National Traumatic Coma Data Bank. Part 1: Design, purpose, goals, and results. *J Neurosurg*. 1983 Aug;59(2):276-84.

3. Martins ET, Linhares MN, Sousa DS, Schroeder HK, Meinerz J, Rigo LA, et al. Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City. *J Trauma*. 2009 Jul;67(1):85-90.

4. Schwarzbald M, Diaz A, Martins ET, Rufino A, Amante LN, Thais ME, et al. Psychiatric disorders and traumatic brain injury. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Aug;4(4):797-816.

5. Perel P, Edwards P, Wentz R, Roberts I. Systematic review of prognostic models in traumatic brain injury. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2006;6:38.

6. Marsh NV, Kersel DA. Frequency of behavioural problems at one year following traumatic brain injury: correspondence between patient and caregiver reports. *Neuropsychol Rehabil*. 2006 Dec;16(6):684-94.

7. Ietswaart M, Milders M, Crawford JR, Currie D, Scott CL. Longitudinal aspects of emotion recognition in patients with traumatic brain injury. *Neuropsychologia*. 2008 Jan 15;46(1):148-59.

8. Larson MJ, Perlstein WM, Demery JA, Stigge-Kaufman DA. Cognitive control impairments in traumatic brain injury. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2006 Aug;28(6):968-86.

9. Sidaros A, Engberg AW, Sidaros K, Liptrot MG, Herning M, Petersen P, et al. Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study. *Brain*. 2008 Feb;131(Pt 2):559-72.

10. Azouvi P. Neuroimaging correlates of cognitive and functional outcome after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*. 2000 Dec;13(6):665-9.

11. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. 2008 Aug;7(8):728-41.

12. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*. 2003 Apr

3;348(14):1365-75.

13. Graham DP, Cardon AL. An update on substance use and treatment following traumatic brain injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1141:148-62.

14. Spaethling JM, Geddes-Klein DM, Miller WJ, von Reyn CR, Singh P, Mesfin M, et al. Linking impact to cellular and molecular sequelae of CNS injury: modeling in vivo complexity with in vitro simplicity. *Prog Brain Res.* 2007;161:27-39.

15. Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.* 2002 Oct;1(6):383-6.

16. Hall ED, Vaishnav RA, Mustafa AG. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010 Jan;7(1):51-61.

17. Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature.* 1983 Jun 2-8;303(5916):396-400.

18. Petronilho F, Feier G, de Souza B, Guglielmi C, Constantino LS, Walz R, et al. Oxidative stress in brain according to traumatic brain injury intensity. *J Surg Res.* 2010 Dec;164(2):316-20.

19. Nayak C, Nayak D, Bhat S, Raja A, Rao A. Relationship between neurological outcome and early oxidative changes in erythrocytes in head injury patients. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(5):629-33.

20. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. Time-relative changes in the erythrocyte antioxidant enzyme activities and their relationship with Glasgow Coma Scale scores in severe head injury patients in the 21-day posttraumatic study period. *Indian J Med Sci.* 2007 Jul;61(7):381-9.

21. Nayak CD, Nayak DM, Raja A, Rao A. Erythrocyte indicators of oxidative changes in patients with graded traumatic head injury. *Neurol India.* 2008 Jan-Mar;56(1):31-5.

22. Scholpp J, Schubert JK, Miekisch W, Noeldge-Schomburg GF. Lipid peroxidation early after brain injury. *J*

Neurotrauma. 2004 Jun;21(6):667-77.

23. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, Schroder N, Quevedo J, Benfato MS, et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 22;291(3):179-82.

24. Dal-Pizzol F, Quevedo J, Streck E, Walz R, Moreira JC. Changes in lipid composition in hippocampus early and late after status epilepticus induced by kainic acid in wistar rats. *Metab Brain Dis*. 2007 Mar;22(1):25-9.

25. Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML, Jr., Walz R, Andrades ME, da Silva EG, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med*. 2001 May 15;30(10):1137-44.

26. Gullo Jda S, Bertotti MM, Silva CC, Schwarzbald M, Diaz AP, Soares FM, et al. Hospital mortality of patients with severe traumatic brain injury is associated with serum PTX3 levels. *Neurocrit Care*. 2011 Apr;14(2):194-9.

27. Hohl A, Gullo JD, Silva CC, Bertotti MM, Felisberto F, Nunes JC, et al. Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: A multivariate analysis. *J Crit Care*. 2011 Jul 30.

28. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Jane JA, et al. The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma*. 1992 Mar;9 Suppl 1:S287-92.

29. Lezak M, Howieson D, Loring DW. *Neuropsychological assessment*. New York: Oxford; 2004.

30. Rey A. *L`examen clinique en psychologie*. Paris: Press Universitaire de France; 1958.

31. Wechsler D. *Wechsler Memory Scale, WMS-III*. San Antonio: The Psychological Corporation; 1997.

32. Wechsler D. *WAIS-III: Manual para administração e avaliação*. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2004.

33. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol*. 2004 Apr;14(2):215-22.

34. Sigurdardottir S, Andelic N, Roe C, Schanke AK. Cognitive recovery and predictors of functional outcome 1 year after traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc.* 2009 Sep;15(5):740-50.
35. Bombardier CH, Fann JR, Temkin NR, Esselman PC, Barber J, Dikmen SS. Rates of major depressive disorder and clinical outcomes following traumatic brain injury. *Jama.* 2010 May 19;303(19):1938-45.
36. Brown AW, Malec JF, Mandrekar J, Diehl NN, Dikmen SS, Sherer M, et al. Predictive utility of weekly post-traumatic amnesia assessments after brain injury: A multicentre analysis. *Brain Inj.* 2010;24(3):472-8.
37. Chu BC, Millis S, Arango-Lasprilla JC, Hanks R, Novack T, Hart T. Measuring recovery in new learning and memory following traumatic brain injury: a mixed-effects modeling approach. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2007 Aug;29(6):617-25.
38. Andriessen TM, Horn J, Franschman G, van der Naalt J, Haitsma I, Jacobs B, et al. Epidemiology, severity classification, and outcome of moderate and severe traumatic brain injury: a prospective multicenter study. *J Neurotrauma.* 2011 Oct;28(10):2019-31.
39. Leitgeb J, Mauritz W, Brazinova A, Janciak I, Majdan M, Wilbacher I, et al. Effects of gender on outcomes after traumatic brain injury. *J Trauma.* 2011 Dec;71(6):1620-6.

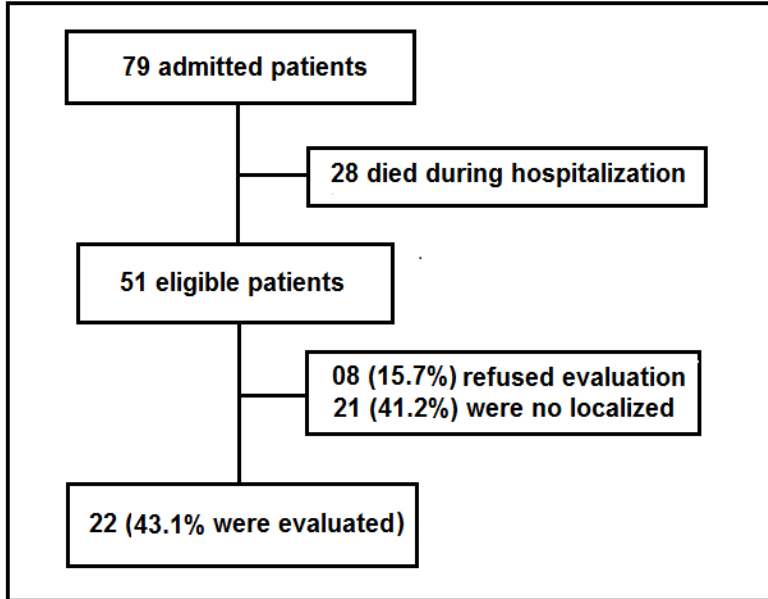


Figure 1. Sampling course of adults patients consecutively admitted at the Intensive Care Unit (ICU) who underwent neuropsychological evaluation.

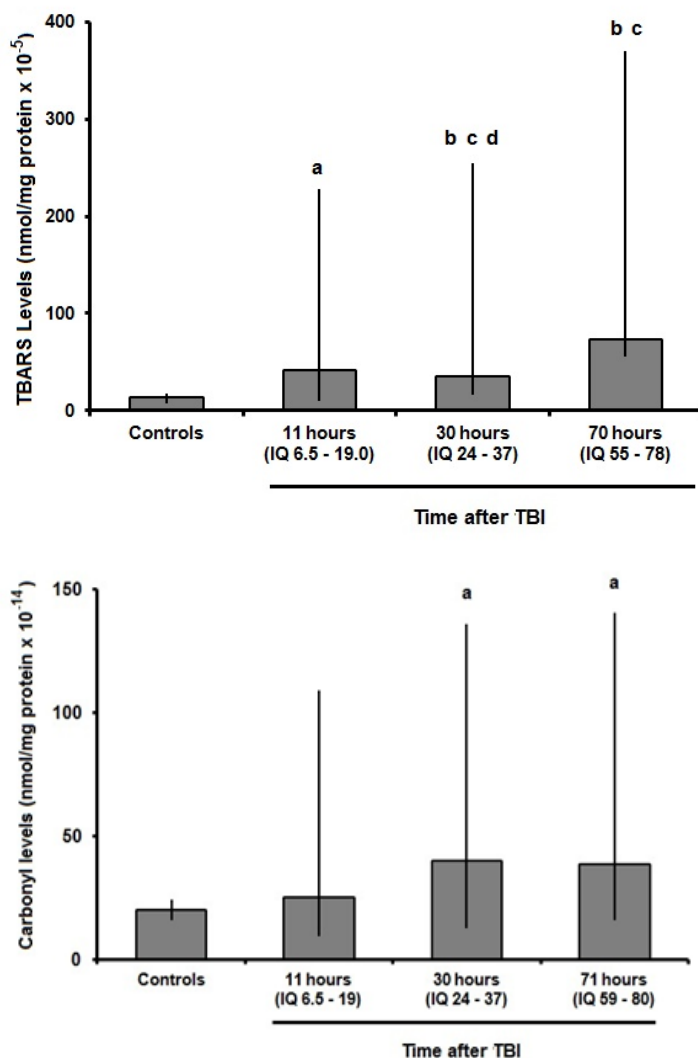


Figure 2: A) Plasma levels of TBARS measured in controls ($n = 10$), and in patients ($n = 19$ to 22 patients/time) in a median of 11, 30, and 71 hours after the severe TBI. ^a Significant difference from the control group ($p = 0.01$); ^b Significant difference from control group ($p < 0.001$). ^c Difference between 71 and 11 hour and between 71 and 30 hours after

TBI ($p < 0.001$). ^d Difference between 30 and 11 hours after TBI ($p = 0.01$). **B**) Plasma levels of Carbonyl measured in controls and in patients after the severe TBI. There were no significant differences between controls and patients at 11 hours after TBI; ^a There was a significant higher levels of Carbonyl in patients at 30 and 71 hours after TBI than controls ($p \leq 0.05$). ^b Significant difference ($p < 0.01$) from 11 hours after trauma. TBI. There were no significant differences between the Carbonyl levels measured after TBI. All data are expressed in median and interquartile range (IQ 25 - 75 percent). Differences between patients and controls were analyzed by Mann-Whitney U test. Differences among patients according to different times after TBI were analyzed by Wilcoxon test.

Table 1. Clinical, demographic, laboratory, radiological, neurosurgical and oxidative stress of patients with severe TBI.

Variables	All Patient N = 51 (%)	Cognitive Examination		p value
		None-evaluated n = 29 (56.9 %)	Evaluated n = 22 (43.1%)	
Sex				
Male	45 (88.2)	25 (85.2)	20 (90.9)	0.68 ^a
Female	06 (11.8)	04 (13.8)	02 (9.1)	
Marshall CT classification				
Type I injury	03 (5.9)	01 (3.4)	02 (9.1)	0.96 ^b
Type II injury	17 (33.3)	10 (34.5)	07 (31.8)	
Type III injury	05 (9.8)	03 (10.3)	02 (9.1)	
Type IV injury	06 (11.8)	03 (10.3)	03 (13.6)	
Evacuated mass lesion	10 (19.6)	06 (20.7)	04 (18.2)	
Non-evacuated lesion	10 (19.6)	06 (20.7)	04 (18.2)	
SAH on admission cranial CT				
Yes	27 (52.9)	13 (44.8)	14 (63.6)	0.26 ^a
No	24 (47.1)	16 (55.2)	08 (36.4)	
Brain surgery				
No	25 (49)	15 (51.7)	10 (45.5)	0.44 ^b
Yes	26 (51)	14 (48.3)	12 (54.5)	
Associated trauma				
Yes	33 (64.7)	17 (58.6)	16 (72.7)	0.38 ^a
No	18 (35.3)	12 (41.4)	06 (27.3)	
Associated trauma type				
Thoracic				0.52 ^a
Yes	08 (15.7)	05 (17.2)	03 (13.6)	
No	43 (84.3)	24 (82.8)	19 (86.4)	
Abdominal				1.0 ^a
Yes	02 (3.9)	01 (3.4)	01 (4.5)	
No	49 (96.1)	28 (96.6)	21 (95.5)	
Limbs				1.0 ^a
Yes	12 (23.5)	07 (24.1)	05 (22.7)	
No	39 (76.5)	22 (75.9)	17 (77.3)	
Admission Glasgow Coma Scale				
7 or 8	24 (47.1)	13 (44.8)	11 (50.0)	0.73 ^b
5 or 6	12 (23.5)	08 (27.6)	04 (18.2)	
3 or 4	15 (29.4)	8 (27.6)	07 (31.8)	
Admission Pupils				
Isocorics	31 (60.8)	17 (58.6)	14 (63.6)	0.45 ^b
Anisocorics	18 (35.3)	10 (34.5)	08 (36/4)	
Midriatics	02 (3.9)	2 (6.9)	0	
		Data expressed mean (± SD)		
Age in years	33.5 (14.2)	34.8 (16.2)	31.7 (11.1)	0.45 ^c
Days in the ICU	12 (7)	12 (8)	11 (5)	0.51 ^c
Days of Hospitalization	29 (21)	30 (19)	23 (23)	0.77 ^c
Systolic blood pressure	128 (30)	127 (27)	128 (35)	0.97 ^c
Diastolic blood pressure	75 (19)	76 (16)	75 (23)	0.86 ^c
Heart rate	89 (20)	90 (15)	90 (25)	0.52 ^a
Respiratory rate	21 (13)	22 (18)	13 (14)	0.66 ^a
Glucose levels (mg/dl)	154 (61)	156 (74)	149 (39)	0.78 ^a
Hematocrit (%)	33.7 (6.5)	34.2 (5.3)	33.1 (67.9)	0.56 ^a
Hemoglobin (g / 100ml)	12.4 (4.8)	11.7 (1.8)	13.2 (7.9)	0.49 ^a
Leukocytes (mm³)	15475 (7374)	15576 (6978)	15346 (8024)	0.92 ^c
		Data are expressed in median (IQ range 25% - 75%)		
Carbonyl levels (nmol/mg protein 10⁴)				
First blood sample (n = 51)	25.3 (9.3 – 93.0)	25.3 (9.0 – 86.6)	26.2 (9.5 – 95.0)	0.89 ^d
Second blood sample (n = 42)	40.0 (12.6 – 108.5)	32.6 (10.3 – 110.8)	52.7 (16.5 – 145.3)	0.33 ^d
Third blood sample (n = 42)	38.3 (15.8 – 140.5)	33.2 (14.6 – 142.0)	46.3 (18.8 – 145.0)	0.73 ^d
TBARS levels (nmol/mg protein 10⁴)				
First blood sample (n = 51)	61.6 (10.2 – 197.0)	38.9 (13.4 – 196.9)	48.7 (8.1 – 199.5)	0.95 ^d
Second blood sample (n = 42)	35.2 (16.6 – 235.6)	23.1 (14.7 – 242.9)	44.6 (33.0 – 236.0)	0.12 ^d
Third blood sample (n = 42)	73.7 (56.2 – 369.5)	74.5 (53.2 – 417.3)	72.9 (59.2 – 321.3)	0.99 ^d

The laboratory were determined in the first blood sample, collected 11 (IQ 25-75 = 6.5 – 19.0) hours after the TBI.

The clinical data were collected at the time of the first blood sample collection.

The second blood sample was collected 30 (IQ 25-75 = 24 – 37) hours after TBI.

Third blood sample was collected 70 (IQ 25-75 = 55 – 78) hours after TBI.

TBARS and Carbonyl levels were not determined in the second and third blood sample of 9 patients.

Glucose levels was not analyzed in 3 patients

a Significant level determined by Fisher exact test.

b Significant level determined by chi-square test.

c Significant difference determined by Student “t” test.

d Significant difference determined by Mann-Whitney U test.

Table 2. Characteristics and neuropsychological evaluation of controls and patients with severe TBI

Variables	Groups		"p" Value ^a
	Patients (n = 22)	Controls (n = 23)	
GENDER			
Male/ Female	20 (90.9) / 5 (9.1)	18 (78.3) / 5 (21.7)	0.41 (F)
Age in years, Mean (± SD)	31.7 (11.1)	35.9 (12.3)	0.61
Education in years, Mean (± SD)	8.4 (4.8)	9.6 (4.5)	0.49
Hand dominance			
Right	19 (86.4)	22 (95.7)	
Left or both	03 (13.6)	01 (4.3)	0.35
Cognitive Tests, Mean (±SD)			
Letters Fluency	15.6 (9.1)	28.3 (8.6)	< 0.0001
Category Fluency	9.6 (4.5)	15.3 (4.3)	< 0.0001
RAVLT			
Total	34.1 (12.6)	45.0 (10.3)	0.003
Retention	5.9 (3.5)	8.9 (2.9)	0.004
Delayed	5.9 (3.7)	9.4 (2.9)	0.001
WMS – III			
Logical Memory, First Recall	15.4 (8.7)	21.5 (7.2)	0.01
Logical Memory I	25.5 (13.4)	35.5 (9.9)	0.007
Logical Memory II	14.0 (10.5)	21.2 (8.5)	0.02
Visual Reproduction I	61.9 (28.1)	78.4 (19.0)	0.02
Visual Reproduction II	35.2 (24.3)	61.5 (22.6)	0.001
Visual Reproduction, Recognition	40.1 (10.5)	42.5 (3.3)	0.31
WAIS – III			
Digit Span	10.4 (4.4)	13.0 (3.9)	0.08
Similarities	15.9 (7.7)	20.5 (7.8)	0.06
Vocabulary	22.8 (11.6)	31.4 (9.9)	0.01
Block Design	26.7 (13.7)	34.3 (12.4)	0.05

^a Significant difference determined by Student "t" test.

Table 3. Correlation between TBARS and carbonyl plasma levels of survivors patients with severe TBI and their long-term cognitive performance.

COGNITIVE TESTS AND BIOCHEMICAL VARIABLES	Spearman's rho Coefficient	"p" Level	COGNITIVE TESTS AND BIOCHEMICAL VARIABLES	Spearman's rho coefficient	"p" Level
Letter Fluency			RAVLT- Delayed		
TBARS levels			TBARS levels		
First blood sample	0.26	0.26	First blood sample	- 0.08	0.74
Second blood sample	0.14	0.56	Second blood sample	0.23	0.37
Third blood sample	0.14	0.60	Third blood sample	0.26	0.34
Carbonyl levels			Carbonyl levels		
First blood sample	- 0.34	0.13	First blood sample	- 0.03	0.88
Second blood sample	- 0.20	0.43	Second blood sample	- 0.10	0.69
Third blood sample	0.03	0.90	Third blood sample	0.32	0.23
Category Fluency			VP II		
TBARS levels			TBARS levels		
First blood sample	0.12	0.61	First blood sample	0.12	0.60
Second blood sample	0.11	0.66	Second blood sample	0.23	0.36
Third blood sample	0.15	0.57	Third blood sample	0.39	0.11
Carbonyl levels			Carbonyl levels		
First blood sample	- 0.25	0.27	First blood sample	- 0.06	0.78
Second blood sample	- 0.21	0.41	Second blood sample	- 0.03	0.89
Third blood sample	0.08	0.76	Third blood sample	0.27	0.28
Similarities			VP Rec		
TBARS levels			TBARS levels		
First blood sample	0.34	0.14	First blood sample	- 0.01	0.95
Second blood sample	0.26	0.32	Second blood sample	0.14	0.59
Third blood sample	0.30	0.26	Third blood sample	0.16	0.56
Carbonyl levels			Carbonyl levels		
First blood sample	- 0.09	0.67	First blood sample	0.09	0.68
Second blood sample	0.24	0.38	Second blood sample	- 0.01	0.98
Third blood sample	0.10	0.71	Third blood sample	0.21	0.42
Vocabulary			LM 1st		
TBARS levels			TBARS levels		
First blood sample	0.27	0.24	First blood sample	0.24	0.30
Second blood sample	0.32	0.20	Second blood sample	0.32	0.21
<u>Third blood sample</u>	<u>0.50</u>	<u>0.04</u> *	Third blood sample	0.14	0.60
Carbonyl levels			Carbonyl levels		
First blood sample	- 0.05	0.82	First blood sample	- 0.04	0.86
Second blood sample	0.22	0.39	Second blood sample	0.10	0.97
Third blood sample	0.24	0.27	Third blood sample	0.08	0.75
Block Design			LM I		
TBARS levels			TBARS levels		
First blood sample	0.42	0.05	First blood sample	0.27	0.24
Second blood sample	0.26	0.29	Second blood sample	0.34	0.20
Third blood sample	0.40	0.10	Third blood sample	0.20	0.44
Carbonyl levels			Carbonyl levels		
First blood sample	0.10	0.66	First blood sample	- 0.05	0.83
Second blood sample	0.06	0.82	Second blood sample	0.04	0.89
Third blood sample	0.26	0.30	Third blood sample	0.14	0.61
RAVLT-Total			LM II		
TBARS levels			TBARS levels		
First blood sample	0.15	0.53	First blood sample	0.17	0.45
Second blood sample	0.23	0.37	Second blood sample	0.03	0.91
Third blood sample	0.26	0.34	Third blood sample	0.08	0.77
Carbonyl levels			Carbonyl levels		
First blood sample	- 0.03	0.88	First blood sample	- 0.09	0.70
Second blood sample	- 0.10	0.69	Second blood sample	- 0.24	0.36
Third blood sample	0.32	0.23	Third blood sample	- 0.02	0.94

TBARS and Carbonyl levels were determined the first blood sample of all patients.

TBARS and Carbonyl levels were determined the second and third blood sample of 21 and 19 patients respectively.

* The significant association between the TBARS levels measured in the third blood sample and the vocabulary were not confirmed ($p = 0.023$) after the adjustment for age and the education level.