

Tesis Doctoral



Universidad de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología

“Papel de la proteína S100B en suero y en orina
como marcador pronóstico de mortalidad tras el
traumatismo craneoencefálico grave.”

Tesis doctoral presentada por Ana Rodríguez Rodríguez, Licenciada en Biología, por la que
opta al grado de Doctor en Biología.

Directores de la Tesis Doctoral:

Dr. Antonio Carrillo Vico

Dr. Juan José Egea Guerrero

ÍNDICE

	pág
I. INTRODUCCIÓN.	8
<hr/>	
1. La enfermedad traumática.	9
1.1. Traumatismo craneoencefálico	10
1.1.1. Fisiopatología del traumatismo craneoencefálico	12
1.1.1.1 Lesión cerebral traumática	13
1.1.1.2. Tipos de lesión traumática	13
1.1.1.3. Mecanismos lesionales	17
2. Clasificación y Pronóstico del TCE grave.	21
2.1. Clasificación tomográfica de Marshall (TCDB)	22
2.2. Glasgow Coma Scale (GCS)	24
2.3. Abbreviated Injury Scale (AIS)	25
2.4. Injury Severity Scale (ISS)	26
2.5. Glasgow Coma Scale (GOS)	27
2.6. Evolución a muerte encefálica	28
3. Biomarcadores de lesión cerebral traumática.	30
3.1 Proteína ácida fibrilar glial	32
3.2. Enolasa Neuroespecífica	33
3.3. Proteína C-TAU.	34
3.4. Isoenzima BB de la Creatín quinasa	34
3.5. Proteína Mielínica Básica	35
3.6. Ubiquitina C terminal Hidroxilasa-L1	35
3.7. Proteína S100B	36

3.7.1. Familia de proteínas S100	36
3.7.2. Proteína S100B	38
3.7.2.1. Propiedades de la S100B	39
3.7.2.2. Localizaciones de la proteína S100B	43
3.7.2.3. Aplicaciones de la S100B en la práctica clínica	46
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	53
III. MATERIAL Y MÉTODO.	55
1. Diseño del estudio	56
2. Unidad de análisis	57
3. Consideraciones éticas	58
4. Variables incluidas en el estudio	59
5. Análisis estadístico	64
IV. RESULTADOS.	69
1. Datos demográficos	70
2. Datos clínicos	71
3. Capacidad predictiva de evolución a muerte encefálica de las distintas variables clínicas	75
4. Capacidad predictiva de evolución a muerte encefálica de la proteína S100B	78
5. Última fase del estudio: evolución de los niveles de S100B, en suero y en orina, a lo largo de las primeras 96 horas de evolución tras el traumatismo. Análisis de la mortalidad al mes del TCE	81
5.1. Evolución temporal de la proteína S100B en suero	84
5.2. Evolución temporal de la proteína S100B en orina	85

5.3. Relación de los niveles de S100B con la gravedad del traumatismo craneoencefálico	86
5.4. Relación de los niveles de S100B en suero y en orina con la mortalidad	87
5.5. Análisis de la capacidad predictiva de las variables clínicas clásicas sobre la mortalidad al mes del traumatismo	88
5.6. Capacidad predictora de mortalidad al mes del traumatismo de la proteína S100B en suero y en orina	90
5.7. Análisis de posibles interferencias en la valoración de los niveles de S100B	92
V. DISCUSIÓN.	94
<hr/>	
1. Papel de la proteína S100B como predictor de muerte encefálica	96
2. Comportamiento de la proteína S100B en suero	99
3. Comportamiento de la proteína S100B en orina	100
4. Proteína S100B y otras variables clínicas	103
4.1. Neurocirugía	103
4.2. Politraumatismos	103
5. Aplicabilidad del estudio	104
6. Fortalezas del estudio	109
7. Limitaciones del estudio	110
VI. CONCLUSIONES	112
<hr/>	
VII. BIBLIOGRAFÍA	114
<hr/>	

I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD TRAUMÁTICA

Los traumatismos son considerados un problema de salud pública a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en aquellos que se encuentran en vías de desarrollo, pues en ambos casos la patología traumática presenta una incidencia en continuo ascenso en las últimas décadas, suponiendo un problema social, sanitario y económico. La mortalidad ha sido tradicionalmente el principal indicador de la magnitud de un problema de salud pública, pero en el caso de la enfermedad traumática no sólo es importante el número de fallecidos, sino el de aquellos que sobreviven con secuelas físicas y emocionales, así como la afección que supone para las familias, comunidades y sociedad en general.

Actualmente la mayoría de las muertes debidas a los traumatismos suceden en los países de renta baja/media (1), y la mitad de ellas ocurre en personas jóvenes, entre los 15 y 44 años de edad, la etapa económica más productiva en la vida de una persona [figura 1].

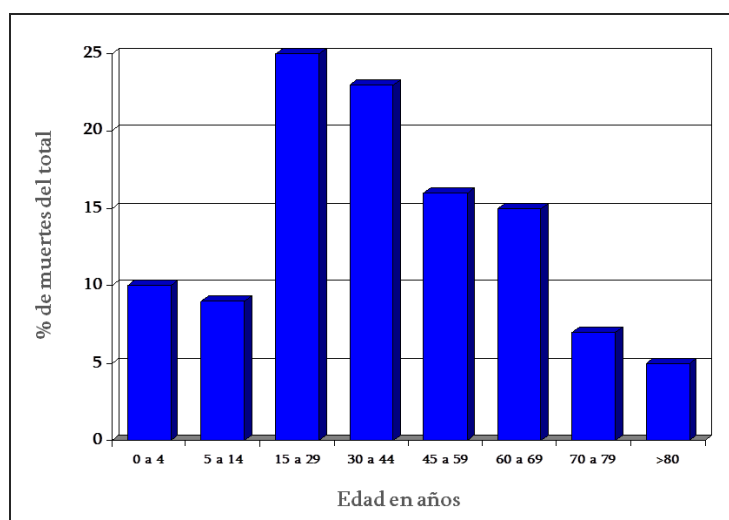


Figura 1. Distribución etárea de la mortalidad por trauma en el mundo, año 2000. (2)

Clásicamente, se ha descrito que la mortalidad de la enfermedad traumática sigue una distribución trimodal, con una mortalidad inmediata del 50%, en relación con las lesiones de los grandes vasos y las lesiones cerebrales. El segundo pico de mortalidad (25%) se presenta durante las primeras 72 horas de ingreso en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), siendo el traumatismo cráneo-encefálico (TCE) una de las causas principales, debido a las propias lesiones directas encefálicas así como el desarrollo de hipertensión endocraneal (HTEC) de difícil control. Por último tendremos la mortalidad tardía, que ocurre a partir del tercer día de evolución, relacionada de forma directa con procesos infecciosos que derivan hacia cuadros de disfunción multiorgánica (3, 4) [figura 2].

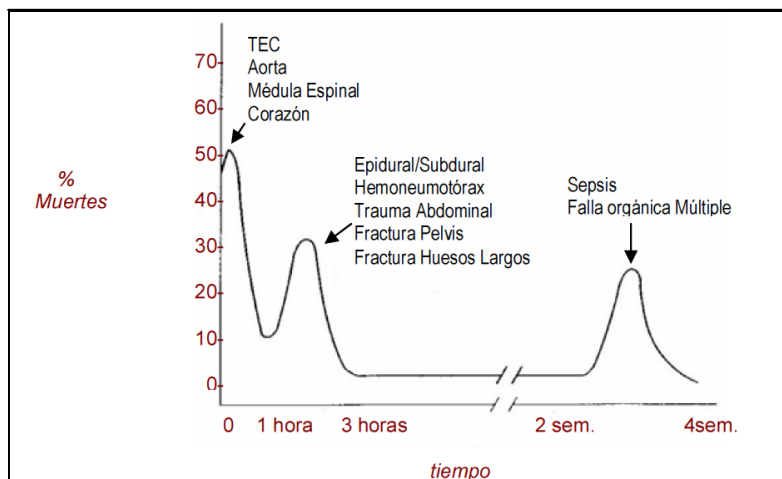


Figura 2. Distribución trimodal de las muertes traumáticas descrita por Trunkey en 1983 (4).

1.1. Traumatismo craneoencefálico

El TCE es definido como un intercambio de energía mecánica, por un impacto directo o por mecanismos bruscos de aceleración-desaceleración, que genera deterioro físico o funcional del contenido craneal, lo cual condiciona alguna de las siguientes manifestaciones clínicas:

1. Confusión o desorientación
2. Pérdida de conciencia
3. Amnesia postraumática
4. Otras anomalías neurológicas como los signos neurológicos focales, las convulsiones y/o la lesión intracraneal

El TCE representa un importante problema de salud pública en todos los países, constituyendo actualmente una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. Existe un claro predominio del sexo masculino de forma independiente a la franja de edad estudiada (5, 6).

Los accidentes de tráfico son la causa más frecuente de TCE cerrado, estando incluidas las lesiones de las personas ocupantes del vehículo, peatones, motociclistas y ciclistas. Las caídas son la segunda causa más frecuente de TCE. Las lesiones por arma de fuego constituyen una causa mayor de lesión penetrante en Estados Unidos y explican hasta el 44% de las anomalías craneales en algunas series. La intoxicación etílica es un factor importante en todas las causas de lesión y en todos los grupos de edad, excepto en niños y ancianos (7).

Las estadísticas indican que los ingresos hospitalarios secundarios a TCE en toda la Unión Europea son de un millón al año (8). Tagliaferri et al. publicaron que el TCE en Europa era una de las principales causas de mortalidad en relación a los traumatismos (9). Según estos análisis, la tasa de incidencia calculada es de 235 casos por cada 100.000 habitantes/año, siendo la tasa de mortalidad del 2,7 %. Concretamente los TCE graves representan un total de 10 casos por 100.000 habitantes/año. La mortalidad o la discapacidad asociada a un TCE dependen del mecanismo lesional y de la gravedad del mismo, pero un pronóstico desfavorable, entendido como muerte, estado vegetativo o discapacidad grave, puede llegar a ser superior a un 20 % en este tipo de pacientes (10).

En España se producen 20.000 ingresos al año relacionados con el TCE. El mecanismo lesional en un tercio de los casos es el accidente de tráfico. Pérez et al. presentó recientemente en nombre de la Sociedad Española de Epidemiología, un estudio elaborado con la información obtenida mediante el Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) en relación al TCE grave en España durante el período 2000-2007 (11). Objetivaron que el TCE ocurre frecuentemente asociado a otros traumatismos, siendo responsable de forma específica de casi la tercera parte de la mortalidad por trauma. En España se produjeron unos 2.500 casos nuevos de TCE grave cada año, de entre los cuales, 20 casos por millón de habitantes sufrieron discapacidad grave y 40 casos por millón de habitantes sufrieron discapacidad moderada.

Sevilla presenta una incidencia anual de TCE aproximadamente de 250 casos por 100.000 habitantes (12).

1.1.1. Fisiopatología del TCE

El sistema nervioso central (SNC) presenta una tasa de consumo metabólico extraordinaria, de aproximadamente el 20% del total del oxígeno inhalado. Sin embargo el cerebro sólo constituye el 2% del peso corporal (13). Esta elevada demanda metabólica se debe a que las neuronas son células altamente diferenciadas y necesitan grandes cantidades de adenosín trifosfato (ATP) para poder mantener un gradiente iónico a través de las membranas celulares, así como para el proceso de neurotransmisión. Los metabolitos requeridos por el cerebro (oxígeno y glucosa principalmente) son transportados por la sangre. Por tanto, el correcto funcionamiento cerebral depende estrechamente de la integridad estructural y funcional del árbol vascular y de su circulación sanguínea (14).

El encéfalo utiliza tres mecanismos de compensación para mantenerse en equilibrio: regulación de la presión, regulación metabólica y regulación del contenido del líquido cefalorraquídeo (LCR). Cuando estos procesos no logran controlar la Presión Intracraneal (PIC), se produce una descompensación cerebral. La elevación de la PIC conduce a hipoxia y muerte celular. Las células cerebrales hipóxicas son incapaces de regular de un modo eficaz los procesos metabólicos, de manera que los productos de desecho se acumulan, aumenta el CO₂ y se genera una situación de acidosis. El sistema cerebral responderá entonces aumentando el flujo sanguíneo, lo cual provocará un mayor incremento de la PIC, creándose un círculo vicioso que, de no romperse, conducirá a una progresión de la lesión cerebral y las secuelas (15).

1.1.1.1. *La lesión cerebral traumática*

Tras un TCE se desencadenan una serie de cascadas bioquímicas y fisiológicas primarias y secundarias que desembocan en un proceso de disfunción y muerte neuronal. El avance más significativo en el conocimiento fisiopatológico del TCE ha sido el constatar que, aunque una proporción variable de las lesiones se producen en el momento mismo del impacto (lesión primaria), muchas de las mismas se desarrollan con posterioridad al accidente (lesiones secundarias), dejando por tanto, un período variable de tiempo para posibles intervenciones terapéuticas.

1.1.1.2. *Tipos de Lesión Traumática*

I. Lesión cerebral primaria

La primera lesión que se produce tras el TCE es consecuencia de la agresión mecánica, que genera un daño inmediato y generalmente irreversible sobre las neuronas, células de la glía y vasculatura cerebral, así como una deformación del tejido, que desencadena un estado de hipoxia e isquemia que, a su vez, provoca daño

cerebral (16, 17). Esa isquemia resulta de una reducción importante en el flujo sanguíneo cerebral, que conlleva un descenso en el aporte de oxígeno y glucosa, así como una acumulación de productos tóxicos, entre ellos los radicales libres (18).

La lesión primaria responde a dos tipos de mecanismos lesionales: (19)

a. *Estático*: lesión por impacto. Un agente externo se aproxima al cráneo, con una energía cinética determinada, hasta impactar con él. Es responsable de fracturas de cráneo y hematomas extra y subdurales. En este caso se generan lesiones focales.

b. *Dinámico*: lesión por impulso, por un mecanismo de aceleración-desaceleración. Es el cráneo el que se desplaza tropezando en su movimiento con un obstáculo generando 2 tipos de movimientos: de tensión (elongación) y de tensión-corte (distorsión angular). El impacto a su vez produce dos tipos de efecto mecánico sobre el cerebro: traslación y rotación. La aceleración rotacional se tolera mucho peor que la traslacional. Es responsable de la degeneración axonal difusa que dará lugar al coma postraumático, contusiones, laceraciones y hematomas intracerebrales. Originándose lesiones difusas.

En cuanto a la clasificación de las lesiones traumáticas primarias en base a los datos proporcionados por la Tomografía Axial Computerizada (TAC), existen dos tipos (19, 20):

i. *Lesión focal*: Es responsable de la degeneración axonal difusa que dará lugar al coma postraumático, contusiones, laceraciones y hematomas intracerebrales. Éstas pueden ser clasificadas como extraaxiales o intraaxiales (cerebrales). El riesgo más importante derivado de la aparición de un hematoma extradural es el desarrollo de HTEC súbita con compresión rápida de estructuras cerebrales. Estas lesiones producen déficits neurológicos por destrucción tisular e isquemia, y sólo son causa de coma

cuando alcanzan un tamaño lo suficientemente importante como para provocar herniaciones cerebrales y compresión secundaria del tronco del encéfalo.

ii. *Lesión difusa*: son aquellas que no ocupan un volumen bien definido dentro del compartimento intracraneal. Se producen como consecuencia de movimientos de rotación y aceleración/desaceleración que dan lugar a lesiones por cizallamiento en la sustancia blanca, cuerpo caloso o en el tronco de encéfalo

II. La lesión cerebral secundaria

La lesión secundaria va a desencadenarse como consecuencia de la hipoxia cerebral. Se va a producir una cascada de procesos fisiológicos y bioquímicos desencadenados por un desbalance entre la demanda y oferta energética, de modo que se produce un cambio del metabolismo celular aerobio a uno anaerobio. Este cambio metabólico estará presente durante horas e incluso días tras el TCE y desembocará igualmente en un daño tisular cerebral (lesión cerebral secundaria) (21, 22). Durante este proceso de generación de daño tisular cerebral se van a activar una serie de rutas, unas de ellas neuroprotectoras y otras neurotóxicas (23, 24), es decir, un incremento del flujo de neurotransmisores excitadores (25) que se traduce en una situación de excitotoxicidad, desequilibrio iónico, disminución de los niveles de ATP, proteólisis y estrés oxidativo (26). El resultado final dependerá de la modulación de los mismos por parte de una serie de biomarcadores (27, 28).

Las lesiones secundarias son las que determinan, entre otras causas, la mortalidad del grupo de pacientes a los que se ha denominado en la literatura “talked and died.” Estos pacientes aparentemente no expresan una clínica neurológica especialmente llamativa, dado que los mecanismos compensatorios son capaces de controlar temporalmente el avance de la lesión cerebral traumática. No obstante, una

vez éstos se muestran insuficientes acontece de forma repentina el fallecimiento por HTEC y herniación cerebral (29).

Entre las causas de origen sistémico, la hipotensión arterial es la etiología más frecuente y de mayor repercusión sobre el pronóstico del TCE (30). Se ha podido demostrar que la hipotensión arterial, incluso por breves períodos, afecta negativamente al resultado y que la mortalidad se eleva tras el TCE si ésta no es controlada enérgicamente. Se piensa que como la autorregulación cerebral se encuentra comprometida y el acoplamiento entre el flujo sanguíneo cerebral y el consumo de oxígeno cerebral está alterado en la fase aguda del TCE, el mecanismo nocivo de la hipotensión arterial debe guardar relación con el consiguiente descenso de la Presión de Perfusión Cerebral (PPC), dando lugar a una isquemia cerebral global. La hipoxemia o isquemia también es una complicación frecuente y que se asocia a un incremento de la mortalidad en el TCE. Los trastornos desencadenados por la isquemia a nivel celular ponen en marcha una cascada de reacciones cíclicas que eventualmente se potencian con la reperfusión, dando lugar al daño de isquemia-reperfusión (31).

Desde un punto de vista terapéutico no podemos incidir sobre la génesis de la lesión primaria, no existe un tratamiento específico, únicamente se pueden tomar medidas preventivas mediante campañas dirigidas a la sociedad en general y a los grupos de riesgo. Por tanto la diana y el manejo de los pacientes que han sufrido un TCE se centra en minimizar el avance de la lesión cerebral secundaria. La lesión secundaria agrava de forma considerable la homeostasis cerebral, siendo por tanto responsable mayor de la morbimortalidad real observada en un alto porcentaje de pacientes que sufren un TCE. Una detección e identificación precoz de este tipo de lesiones resultaría en la aplicación de medidas terapéuticas adecuadas y dirigidas a la situación real en la que se encuentra el paciente.

El objetivo final trata de mejorar el metabolismo aeróbico, mediante la manipulación en la oferta de oxígeno al cerebro, reducción de los factores extracraneales perjudiciales para el metabolismo celular cerebral, así como la minimización de la excitotoxicidad neuronal secundaria (32, 33). Conseguir la prevención de la lesión secundaria, o minimizarla en su defecto, redundaría de forma directa en un menor número de secuelas, así como lograría mejorar las cifras de mortalidad en estos pacientes (32, 34, 35).

1.1.1.3. *Mecanismos lesionales*

Isquemia-reperfusión

La lesión por reperfusión es el principal factor promotor del estrés oxidativo. Como consecuencia de la isquemia cerebral se produce un déficit de oxígeno y glucosa a nivel cerebral que va a conllevar una inversión en los transportadores de glutamato de modo que se producirá una liberación del mismo, produciendo una situación de excitotoxicidad (36). Además se producirá un cambio del metabolismo aerobio a uno anaerobio, con la consiguiente formación de lactato y pirúvico, generando un estado de acidosis que activará los canales de calcio pH dependientes (37). La apertura de estos canales de calcio así como de los receptores ionotrópicos de glutamato favorecerá un flujo de calcio hacia el interior neuronal, lo que inactivará la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias y activará proteasas y fosfolipasas dependientes de calcio (37).

Durante la fase de reperfusión, las enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno (ROS) van a obtener oxígeno suficiente como para poder generar grandes cantidades de ROS. La mayor parte de las ROS que llevan a una situación de estrés oxidativo se forman durante la fase de reperfusión.

Hipertensión Endocraneal

Entre las causas intracraneanas de lesión secundaria, la HTEC es la más frecuente y la que, de forma inequívoca, afecta al pronóstico del TCE. La HTEC se traduce básicamente en una alteración en el volumen del contenido intracraneal. La HTEC altera la función cerebral provocando un descenso de la PPC con la consiguiente reducción del Flujo Sanguíneo Cerebral (FSC) regional o global. Cuando la reducción del FSC desciende por debajo de ciertos niveles, se producen lesiones por hipoperfusión que, si se prolongan, evolucionarán a infartos cerebrales con necrosis tisular irreversible, lo cual dará lugar a manifestaciones clínicas patológicas con carácter permanente (38).

La HTEC ejerce su efecto nocivo a través del aumento de conos de presión que generan isquemia cerebral global por descenso de la PPC, o bien isquemias a nivel local al comprimir las arterias cerebrales, sobre todo las arterias cerebrales posteriores y anteriores (39). Las crisis convulsivas, generalizadas o focales, producen lesión secundaria por el aumento del flujo sanguíneo cerebral y el mayor consumo cerebral de oxígeno. La posibilidad de conocer indirectamente el metabolismo cerebral ha puesto de manifiesto la existencia de un desacoplamiento entre el FSC y el consumo cerebral de oxígeno. La traducción clínica de este fenómeno es el estado de hipoperfusión cerebral, principal causa de lesión secundaria, y el estado de hiperemia cerebral. La hiperemia es un inductor de lesión cerebral secundaria, que además desempeña un papel importante en la fisiopatología de la HTEC, así como en el edema. El edema cerebral o swelling, se produce como consecuencia de un aumento del volumen sanguíneo cerebral, que, *per se* no es deletéreo, pero puede causar una compresión cerebral focal o global. Se han descrito varios tipos de edemas cerebrales:

a. *Edema vasogénico*: debido a la alteración de la barrera hemato-encefálica (BHE). Se produce por una salida de fluido rico en proteínas del compartimento

intravascular al extravascular, como consecuencia del daño endotelial capilar. Esta pérdida de proteínas es responsable de la gravedad del daño.

b. *Edema citotóxico*: de localización intracelular, en la sustancia gris. Se desarrolla con el fallo de la membrana celular y de los mecanismos dependientes de ATP, por pérdida de la homeostasis iónica y gradientes osmolares.

c. *Edema intersticial*: debido a alteraciones en la presión intraventricular del LCR. Se produce por desplazamiento de fluidos desde los ventrículos hacia el intersticio periventricular.

Aunque la causa principal de que el edema origine alteraciones neurológicas es la propia HTEC, en el cerebro traumatizado las lesiones causadas por el edema obedecen a mecanismos que no tienen relación alguna con la génesis de la HTEC. En concreto, en el edema vasogénico la permeabilidad alterada de la BHE permite el paso de ciertos metabolitos que propician lesiones de las membranas celulares, que a su vez aumenta la capacidad edematógena de estas sustancias. Por otra parte, el edema cerebral separa los capilares de las células cerebrales perturbando el aporte de oxígeno y nutrientes a las células encefálicas (40).

Estrés oxidativo

Como consecuencia de la lesión generada en el TCE se van a generar un exceso de ROS, producto de una serie de mecanismos entre los que se encuentran la activación de neutrófilos, células endoteliales, células neuronales y de la glía, iones de hierro (liberados de la degradación de la hemoglobina en áreas hemorrágicas) así como reperusión cerebral (41, 42). En un estado de isquemia transitoria se va a

producir un incremento en los niveles de aminoácidos excitatorios así como de ROS (43).

Existe una relación directa entre el grado de estrés oxidativo y la patogénesis del TCE (44). Un aumento en la producción de ROS así como de las especies reactivas del nitrógeno (RNS), es decir, un incremento del estrés oxidativo (45, 46), produce una peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos (47-51). El cerebro es altamente sensible al ataque de los radicales libres y la peroxidación lipídica (LPO) por su elevado contenido en grasas poliinsaturadas. El propio organismo produce una serie de antioxidantes que van a proteger al cerebro de este daño oxidativo. Entre ellos se encuentran la Glutathion peroxidasa (GPx) y la Glutathion reductasa (GR), ambas enzimas antioxidantes intracelulares. La GPx actúa de forma conjunta con la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), neutralizando los radicales superóxido. Otras enzimas son la Glutathion-S-transferasa (GST), que va a detoxificar sustancias deletéreas y la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PD), que proporciona electrones para el sistema de defensa antioxidante (52, 53).

El estrés oxidativo, junto con el compromiso metabólico y la excitotoxicidad, juegan un papel clave en el proceso neurodegenerativo apoptótico y necrótico (54). El estado de estrés oxidativo es reflejo del desbalance que existe entre la tasa de ROS y su neutralización por los sistemas antioxidantes. Este desbalance se habrá producido como consecuencia de bien una sobreproducción de ROS o de una reducción de las defensas antioxidantes (48, 55-57). El cerebro es especialmente vulnerable al estrés oxidativo debido a su elevada tasa de consumo de oxígeno, alta producción de radicales reactivos y su elevado nivel de transmisión de metales, como el hierro, que catalizan la producción de estos radicales reactivos (58).

Los sistemas de defensa celular, tales como el glutatión (GSH) y otras enzimas antioxidantes, protegen los tejidos del daño de los radicales libres. El GSH es la

principal molécula intracelular antioxidante. Juega un papel crucial en la detoxificación de peróxidos y toxinas electrofílicas como sustrato para la GPx y la GST, en conjunción con nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), formando disulfuro de glutatión (GSSG) como producto final de la reacción (59, 60). Este producto será reconvertido a GSH por acción de la GR. La GPx proporciona protección frente al estrés oxidativo generado tras un TCE. Una disminución de la actividad de la GPx afectará directamente a la eliminación de ROS y lípidos peroxidados (61). La GST va a eliminar los productos de la peroxidación lipídica en conjunción con el glutatión. Una disminución de los niveles de GST resultará en un incremento del estrés oxidativo y disminución de los niveles de GSH (48). El balance del ratio GSH/GSSG depende a su vez de los niveles de NADPH, un importante cofactor producido en una reacción enzimática catalizada por la G-6PD y por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

2. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO DEL TCE GRAVE.

Los elementos que definen la gravedad y el riesgo evolutivo de los pacientes tras un TCE grave son varios, entre los que se incluyen: la repercusión sobre el nivel de conciencia, la duración de los trastornos de la misma y la coexistencia de otros elementos, ya sea de daño estructural, comorbilidades, lesiones traumáticas asociadas u otros factores asociados que puedan sobreañadir al cuadro clínico un incremento en el riesgo. Todos ellos deben ser tenidos en cuenta para establecer la evolución del paciente.

2.1. Clasificación tomográfica de Marshall.

La clasificación del Traumatic Coma Databank (TCDB) descrita en 1991 por Marshall fue elaborada con el objetivo de identificar a los pacientes con “alto riesgo” de mala evolución clínica en función de los hallazgos de la (TAC craneal, entendiéndose como dicha situación: la posibilidad de desarrollar episodios de HTEC durante el curso evolutivo, la existencia de lesiones con elevada mortalidad asociada y aquellos casos donde, de forma independiente a la situación clínica, presentan signos radiológicos de mal pronóstico (62).

Esta clasificación presenta seis categorías dependientes de las lesiones objetivadas en la tomografía: cuatro de ellas indican lesión difusa con incremento en el grado de gravedad según el estado de las cisternas mesencefálicas, el grado de desviación de la línea media y la presencia o ausencia de lesiones mayores de 25 cc. Las otras dos categorías indican la presencia de lesión con efecto masa (>25cc) evacuada, o no evacuada quirúrgicamente. [Tabla 1]

Categoría	Definición
Lesión difusa I	TAC normal, sin alteraciones visibles
Lesión difusa II	Cisternas presentes, con desviación de línea media 0-5 mm Lesión de diferente densidad, <25cc Puede incluir fragmentos óseos y cuerpos extraños
Lesión difusa III (Swelling/Edema)	Cisternas comprimidas o ausentes con desplazamiento de la línea media de 0-5 mm. Sin lesiones de densidad alta o mixta > 25 cc
Lesión difusa IV (Shift/Desviación)	Desviación de la línea media > 5 mm. Sin lesiones de densidad alta o mixta > 25 cc
Lesión focal evacuada	Cualquier lesión evacuada quirúrgicamente
Lesión focal no evacuada	Lesión de densidad alta o mixta >25 cm ³ no evacuada quirúrgicamente

Tabla 1. Clasificación tomográfica del traumatismo craneoencefálico según la clasificación de Marshall o *Traumatic Coma Data Bank* (TDB)

Marshall et al. realizaron un estudio con 746 pacientes que sufrieron un TCE grave, en el que analizaron la correlación existente entre el tipo de lesión presente en la TAC y el resultado final del paciente, evaluado según la Glasgow Outcome Scale (GOS). Comprobaron que existía una fuerte correlación: a medida que aumentaba el grado de lesión difusa y/o las lesiones tipo masa no evacuada frente a las evacuadas, aumentaba el porcentaje de HTEC y de mal resultado clínico.

Años más tarde, Servadei et al. y Maas et al. corroboraron los resultados obtenidos por Marshall. De este modo la TCDB quedó establecida como escala radiológica de referencia por su valor pronóstico de mortalidad y resultados funcionales (63, 64), siendo en la actualidad la escala más utilizada en los trabajos relacionados con el TCE grave.

2.2. GCS (Glasgow Coma Scale)

En 1974 Teasdale describió la Escala de Glasgow, con objeto de proporcionar los conocimientos necesarios para valorar el nivel de conciencia del paciente tras un trauma craneal. Con el paso del tiempo, esta variable se ha convertido en un uno de los datos más significativos que permiten evaluar la gravedad del TCE (65).

La GCS lleva a cabo una valoración del nivel de conciencia, que permite, a través de los cambios en su puntuación, reflejar el estado evolutivo del paciente. La medida se lleva a cabo mediante la suma de tres respuestas independientes: apertura ocular, respuesta verbal y motora. La escala representa la suma del valor numérico de cada una de las categorías. El valor máximo corresponde a 15 puntos, que implica un nivel de conciencia normal. Siendo el valor mínimo de 3 puntos, el cual se alcanza ante una respuesta de coma arreactivo. [Tabla 2]

Apertura ocular	Esponánea	4
	Estímulo verbal	3
	Sólo al dolor	2
	Sin respuesta	1
Respuesta motora	Orientada, apropiada	5
	Confuso	4
	Inapropiado	3
	Incomprensible	2
	Sin respuesta	1
Respuesta verbal	Obedece órdenes	6
	Localiza estímulos dolorosos	5
	Retrae en respuesta al dolor	4
	Flexiona en respuesta al dolor	3
	Extiende en respuesta al dolor	2
	Sin respuesta	1
Total		15

Tabla 2. Escala de Coma de Glasgow. * Respuesta ante estímulo nociceptivo

La estratificación de los niveles de gravedad de la GCS tras el TCE se asocia a la intensidad de afectación/lesión cerebral del individuo. Hoy en día se reconoce únicamente como TCE leve a los pacientes que presentan una puntuación en la GCS comprendido entre 14 y 15 puntos. El TCE grave se considera cuando la puntuación es inferior o igual a 8 puntos. Aquellos pacientes cuya puntuación quede comprendida entre 8 y 13 presentarán un TCE moderado.

Hay que tener en cuenta que ciertas circunstancias extracraneales pueden artefactar el resultado de la evaluación de dicha escala, como puede ser la presencia de hipotensión arterial, hipotermia, trastornos metabólicos, así como el consumo de alcohol, drogas de abuso u otros fármacos depresores del sistema nervioso que puedan alterar la placa motora neuromuscular.

2.3. AIS (Abbreviated Injury Scale)

La Escala Abreviada de Lesiones o *Abbreviated Injury Scale* (AIS), es un sistema de puntuación anatómica introducido por primera vez en 1969. Desde entonces ha sido revisado y actualizado en numerosas ocasiones. Actualmente se utiliza el AIS 90 que ofrece una clasificación bastante exacta de la gravedad de la lesión traumática (66, 67).

El AIS puntúa en relación con la gravedad de la lesión:

- 1: menor.
- 2: moderada.
- 3: grave pero no amenaza la vida.
- 4: amenaza la vida, aunque la supervivencia es probable.
- 5: amenaza la vida, supervivencia poco probable.
- 6: fatal, incompatible con la vida.

Esta escala se genera como representación del grado de “amenaza para la vida” que suponen las lesiones para el paciente, por lo que no puede considerarse una representación de la medida global de gravedad (67).

2.4. ISS (Injury Severity Score)

La escala Injury Severity Score (ISS) fue diseñada por Baker en 1974. Es un sistema que proporciona una puntuación global de la gravedad del traumatismo para aquellos pacientes con lesiones traumáticas múltiples. Su utilidad radica en la posibilidad de comparar la mortalidad entre pacientes politraumatizados, fundamentalmente tras traumatismos cerrados (68).

La puntuación alcanzada en el ISS corresponde a la suma de los cuadrados de la puntuación AIS más alta en los tres órganos o sistemas más gravemente dañados de entre los siguientes:

- a. Cabeza y cuello.
- b. Cara.
- c. Tórax.
- d. Abdomen y órganos pélvicos.
- e. Extremidades.
- f. Superficie corporal.

La mayor puntuación alcanzable es 75. Si el paciente presenta un AIS de 6 en alguno de estos órganos o sistemas (imposibilidad de supervivencia ante tal lesión), automáticamente se le asigna un ISS de 75, independientemente de la puntuación AIS que presente en las demás regiones del cuerpo.

A pesar de que el ISS relaciona linealmente con la mortalidad, morbilidad y estancia hospitalaria, presenta una serie de limitaciones, entre ellas el hecho de que pueden sucederse múltiples lesiones graves sobre la misma área, provocando una infraestimación del ISS y de la gravedad del paciente, pues se tendrá en cuenta como una única lesión de esa región.

Con objeto de subsanar las limitaciones que presenta esta escala, Brenneman et al. diseñaron a finales de los 90 el "New Injury Severity Score" (NISS), calculado como el cuadrado de las tres lesiones más graves de la economía del paciente, de manera independiente de la región del cuerpo, pudiéndose repetir dos áreas corporales como elementos de puntuación (69).

2.5. GOS (Glasgow Outcome Scale)

La Glasgow Outcome Scale (GOS) fue desarrollada por Jennett y Bond como herramienta de medición de la repercusión social que originaba el TCE a los seis meses del accidente, y ha sido utilizada típicamente para evaluar resultados en estudios neuroquirúrgicos, así como en ensayos clínicos de fármacos relacionados con el TCE (70).

La escala posee cinco categorías, siendo la puntuación más alta la que corresponde al mejor resultado. [Tabla 3]

Puntuación	Descripción
1	Muerte.
2	Estado Vegetativo. No hay evidencia de actividad cortical.
3	Incapacidad Grave. Consciente, pero discapacitado. Necesita asistencia para las tareas diarias por discapacidad mental y/o física.
4	Incapacidad Moderada. Discapacitado, pero independiente. Puede hacer sus tareas diarias, pero no reintegrarse al trabajo o al estudio. Las discapacidades incluyen distintos grados de disfasia, hemiparesia o ataxia, como así también déficits de memoria, intelectuales y cambios de personalidad.
5	Buena recuperación. Se reintegra a su actividad previa. Puede presentar déficits neurológicos o psicológicos menores.

Tabla 3. Glasgow Outcome Scale.

Esta escala no se utiliza para el manejo clínico del paciente, sino más bien para cuantificar el nivel de recuperación de pacientes que han sufrido una lesión cerebral traumática, resultado valorado en estudios de investigación, estudios neuroquirúrgicos y ensayos clínicos con fármacos.

2.6. Evolución a muerte encefálica

En la población adulta, la principal causa de muerte encefálica (ME) es el TCE y la hemorragia subaracnoidea (HSA), mientras que en la población pediátrica lo son los accidentes de tráfico y la asfixia (71, 72).

El concepto de ME ha evolucionado mucho desde su primera definición en 1959, cuando Mollaret y Goulon introdujeron el término *coma dépassé* (coma irreversible) para hacer referencia a la situación que presentaban los pacientes cuando habían perdido el estado de conciencia, no presentaban reflejos en el tronco encéfalo,

no respiraban y los electroencefalogramas aparecían planos (73). Desde que la escuela medica de Harvard publicara en JAMA la "definición del Coma irreversible" en 1968, se trabaja en el concepto de los criterios neurológicos para determinar la muerte de una persona, lo cual hoy en día continua siendo punto de discusión (74)

El diagnóstico clínico de ME está basado en la ausencia irreversible de respuesta de reflejos troncoencefálicos y de actividad cortical. La declaración de ME requiere además el establecimiento de la causa de coma, la constatación de la irreversibilidad, el reconocimiento de posibles factores de confusión, la interpretación de los hallazgos en las técnicas de neuroimagen, así como la realización de pruebas de laboratorio confirmatorias de dicha situación de ME (75).

Actualmente, la mayor parte de los programas de donación y trasplante de órganos se sustentan en los órganos provenientes de los donantes en ME, aunque ante la reducción progresiva del número de TCE, se están buscando nuevas estrategias para aumentar el pool de donantes, ampliando criterios (donante expandido) o potenciando nuevas estrategias (donante a corazón parado).

La ME se acompaña de una serie de efectos sistémicos, hemodinámicos, hormonales e inflamatorios que tienen una repercusión relevante en los órganos y los tejidos de toda la economía (76). La ME puede considerarse como el mayor factor de estrés al que se someten los órganos antes del trasplante, siendo inductora de una importante respuesta inflamatoria. En 2008, Murugan et al., realizaron un estudio en el que evaluaron la respuesta inflamatoria en un grupo de donantes, mediante el análisis de las concentraciones de diversas citoquinas desde el momento del diagnóstico de ME y posteriormente cada 4 horas hasta la extracción de los órganos (77). Estos investigadores comprobaron que existe una fuerte correlación entre el grado de expresión de citoquinas y la supervivencia: todos los donantes presentaban unos niveles considerablemente elevados de citoquinas, y en concreto los niveles

elevados de IL-6 se correlacionan con un peor pronóstico del receptor a los seis meses del alta hospitalaria. Estos hallazgos clínicos indican que existen diversos factores inmunológicos y no inmunológicos que pueden influir en el resultado final del trasplante (78, 79).

Actualmente existen muchas técnicas incluidas en guías para el manejo de los pacientes que han sufrido un TCE grave, las cuáles proporcionan información sobre la evolución del paciente y el posible pronóstico. Pero cuando se trata del pronóstico de ME, la mayoría de los estudios llevados a cabo en este campo intentan relacionar los resultados de las técnicas de neuromonitorización y el momento del diagnóstico de ME, pero pocos intentan adelantarse a este resultado (80-82). A pesar de ello sí que existen algunos estudios que han valorado los niveles de diversos biomarcadores como pronóstico de ME. El biomarcador más estudiado en este caso ha sido la proteína S100B (83-85), cuya capacidad pronóstica tras un TCE grave frente a la de otros biomarcadores ha sido ampliamente probada (86-88).

3. BIOMARCADORES DE LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA

De acuerdo con la definición propuesta en 1998 por los “National Institutes of Health” (NIH), *“un biomarcador es una característica que es medida objetivamente y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”* (89).

Antiguamente, se empleaban como biomarcadores indicadores fisiológicos, tales como la presión arterial o las pulsaciones cardíacas. En los últimos tiempos, el término “biomarcador” se ha venido asociando a indicadores moleculares de enfermedades, que pueden determinarse, por ejemplo, en fluidos orgánicos tales como el LCR o suero. Estos biomarcadores moleculares pueden ser metabolitos específicos,

genes, productos de genes, enzimas u hormonas, cuya determinación servirá para el diagnóstico, pronóstico o valoración de un tratamiento.

A pesar de los progresos llevados a cabo en el manejo clínico, los avances en las técnicas de imagen a través de la tomografía, la resonancia magnética nuclear, la monitorización cerebral, etc (90); a día de hoy estos datos son insuficientes para poder establecer el pronóstico de los pacientes. Por tanto, podemos concluir que no se dispone actualmente de un elemento predictor que sirva de guía a largo plazo durante el tratamiento agudo del TCE grave en la UCI, y éste es necesario. Debemos conocer cuándo y en qué pacientes debemos aplicar un determinado nivel de tratamiento médico y/o quirúrgico óptimo. Un ajuste más preciso de tales medidas repercutirá en una menor progresión de la lesión cerebral secundaria, y en definitiva, en un mejor manejo de los pacientes que sufren un TCE grave.

Aunque actualmente no existen biomarcadores con utilidad clínica demostrada para el diagnóstico de la lesión cerebral, ya sea causada por un TCE, accidente cerebrovascular u otras lesiones cerebrales agudas, los diversos estudios de investigación llevados a cabo en esta área han puesto de manifiesto el potencial que presentan varios biomarcadores. Los que actualmente generan más interés incluyen la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteínas microtubulares (TAU), enolasa neuroespecífica (NSE) y S100B. Estos biomarcadores, independientemente a los hallazgos clínicos y radiológicos, muestran la situación cerebral global a nivel celular, así como el grado de disfunción cerebral (91-94).

Por lo general, los niveles de estos biomarcadores de naturaleza proteica aumentan después de la lesión y sus concentraciones presentan una correlación positiva con el grado o magnitud de la lesión. En su mayoría, estas proteínas van a pasar al torrente sanguíneo como consecuencia de la disrupción de la BHE (95). La

vida media de estos biomarcadores en sangre es un factor importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la concentración sérica de los mismos.

El biomarcador ideal de daño cerebral debería cumplir una serie de requisitos (96-98):

- Alta sensibilidad y especificidad.
- Liberación única tras la destrucción irreversible del tejido cerebral.
- Aparición precoz en sangre periférica.
- Correlación temporal con la aparición de las lesiones cerebrales.

3.1. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP).

La GFAP es una proteína monomérica, de 40-53 kDa, que se sintetiza de forma casi exclusiva en los astrocitos. Forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto, y está implicada en procesos de proliferación astrocítica, plasticidad sináptica, la homeostasis de glutamato, crecimiento de neuritas, mielinización, mantenimiento de la permeabilidad e integridad estructural de la BHE y protección y reparación de la lesión en el tejido neuronal tras una situación de isquemia cerebral (99). En condiciones fisiológicas o patológicas sin alteración cerebral, esta proteína no se encontrará en sangre (92, 100). Pero como ya anticipábamos, la GFAP no es exclusiva de astrocitos. Investigaciones recientes han demostrado la presencia de GFAP en células no nerviosas, tales como células mioepiteliales, condrocitos, fibroblastos y linfocitos (101).

Diversos estudios han demostrado su capacidad como predictora de muerte, así como de mala evolución clínica del paciente con TCE grave (102). En 2010, Vos et al.,

publican un artículo en el cuál confirman, tras realizar un estudio comparativo entre GFAP y S100B en pacientes que han sufrido un TCE grave, que ambos marcadores son buenos predictores de muerte, mostrando la proteína S100B una mayor capacidad predictiva (102). Otros autores han descrito que la concentración de GFAP en suero se encuentra elevada en modelos animales de isquemia cerebral, como consecuencia de una situación de astrogliosis (103).

3.2. Enolasa Neuroespecífica (NSE)

La NSE es una isoenzima dimérica de un peso molecular de 78 kDa. Su ubicación principal se encuentra en el citoplasma de las neuronas (isoforma $\gamma\gamma$) y, en menor medida, en nervios periféricos, sistema endocrino, plaquetas y eritrocitos (isoforma $\alpha\gamma$) (104). De ahí que sus niveles séricos se incrementen ante una lesión cerebral, pero también ante la presencia de tumores neuroendocrinos o incluso en presencia de hemólisis (105). Para evitar interferencias por hemólisis, la muestra debe centrifugarse en el plazo de una hora desde su extracción. Su vida media se encuentra estimada en 24 horas, y presenta un aclaramiento renal. Debido a este tipo de aclaramiento, debemos considerar una posible interferencia en aquellos pacientes con insuficiencia renal (106).

La función de esta enzima se encuentra relacionada con los aumentos de cloruro durante la actividad neuronal. Tras el daño cerebral, la NSE es liberada de forma pasiva tras la ruptura celular.

Diversos estudios han descrito que niveles séricos superiores a 21.7 $\mu\text{g/L}$ se correlacionan con una mala evolución de los pacientes tras la lesión traumática cerebral, pero debido a su baja sensibilidad (80%) y especificidad (55%) sólo se ha

sugerido como herramienta de cribaje, nunca como biomarcador con valor pronóstico (102).

3.3. Proteína C-TAU.

TAU es una proteína asociada al microtúbulo, involucrada en la estabilización del citoesqueleto axonal y del transporte de vesículas en la sinapsis neuronal. Tiene un peso molecular de unos 45-68 kDa. Ante una lesión cerebral traumática, sufre un proceso de proteólisis, dando lugar a fragmentos denominados C-TAU. La fosforilación de TAU se asocia a muerte neuronal y se observa en trastornos degenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (107), así como en situaciones de hipotermia perioperatoria y episodios de isquemia cerebral transitoria (108). En relación al análisis de C-TAU en situaciones de lesión cerebral traumática, existen estudios en modelos animales (ratas), que han determinado la presencia de niveles séricos elevados de dicho fragmento en las seis horas posteriores a una contusión cerebral controlada (109). Sin embargo, en los estudios realizados en humanos los resultados en cuanto a su valor pronóstico son contradictorios (110, 111).

3.4. Isoenzima BB de la creatinquinasa (CK-BB).

La isoforma BB de la enzima CK es característica del tejido nervioso, pero también se presenta en el sistema gastrointestinal y en útero. Presenta una vida media corta, entre una y cinco horas. Juega un papel importante en el metabolismo energético de las células neuronales.

Algunos estudios han demostrado la existencia de una correlación directa entre la intensidad de la lesión cerebral y los niveles de CK-BB en LCR, pero al realizar los

mismos análisis en sangre periférica dicha correlación desaparece (112). En este caso no podríamos discernir si la ausencia de CK-BB en sangre se debe a que la BHE permanece intacta, o a que la proteína pasó a suero pero fue inmediatamente eliminada, dado que presenta una vida media corta.

3.5. Proteína Mielínica Básica (MBP).

La proteína mielínica básica tiene un papel muy importante en el proceso de mielinización de los axones del SNC. Una lesión de la sustancia blanca induce un incremento en los niveles de dicha proteína tanto en LCR como en suero, manteniéndose dicho incremento hasta dos semanas después de la lesión. Como principales inconvenientes se han postulado su elevación ante un proceso de hemólisis. Su especificidad en el diagnóstico de lesión cerebral traumática leve es del 96%, pero presenta una muy baja sensibilidad (44%) (113).

3.6. Ubiquitina C terminal Hidroxilasa-L1 (UCH-L1)

UCH-L1 es una proteína neuronal altamente específica que se concentra en los somas neuronales, en la sustancia gris. Su peso molecular aproximado es de 24 kDa. Su función enzimática está relacionada con la eliminación de proteínas mal plegadas y la oxidación de proteínas a nivel del SNC. Se han descrito otras fuentes de secreción de UCH-L1, pero cuya aportación resulta insignificante en situaciones de lesión del SNC. Por ello se considera un biomarcador específico del SNC (114).

Estudios preclínicos en animales han mostrado que UCH-L1 se libera al LCR tras la lesión cerebral traumática, así como en el accidente cerebrovascular experimental, ambas situaciones de lesión cerebral aguda (115). En humanos, la UCH-

L1 se relaciona con enfermedades neurodegenerativas tales como la Esclerosis múltiple y el Parkinson (116, 117). También se han estudiado los niveles de UCH-L1 en pacientes con HSA espontánea. Los investigadores observaron que la concentración de UCH-L1 se mantuvo elevada a lo largo dos semanas tras la HSA espontánea, correlacionándose con una peor evolución de los pacientes (118).

3.7. Proteína S100B

3.7.1. *Familia de proteínas S100*

Las proteínas S100 pertenecen a una familia multigénica de proteínas caracterizadas por presentar en su estructura dos sitios de unión a calcio con estructura hélice-lazo-hélice. Su nombre deriva del hecho de ser 100% soluble en una solución de sulfato de amonio a pH neutro (119). Actualmente se conocen hasta 25 miembros de esta familia, expresados de forma exclusiva en vertebrados. En cuanto a la localización de los genes que codifican para estas proteínas, 21 de ellos se encuentran en el cromosoma 21 locus 1q21, los que constituirían el conocido como “complejo de diferenciación epidérmico”. Las demás proteínas S100 se encuentran codificadas por genes situados en otros cromosomas (120, 121) [Tabla 4].

Miembros de la familia de proteínas S100	Loci cromosómicos
S100A1-S100A18 trichohylin fillagrin repetin	1q21
S100B	21q22
S100G	Xp22
S100P	4p16
S100Z	5q14

Tabla 4. Miembros de la familia S100 y su localización génica específica.

Las proteínas S100 actúan como sensores de calcio, las cuáles se activan por el mensajero secundario Ca^{2+} e interaccionan con proteínas intracelulares, regulando su actividad. A pesar de esta afinidad por el calcio hemos de destacar que es mucho menor que la presentada por la calmodulina, sensor universal de Ca^{2+} intracelular (122). Sin embargo, no todas las proteínas de la familia S100 presentan afinidad por calcio. Excepciones a esta norma son la S100A10, que está implicada en funciones de regulación independientes de calcio, y la S100G, un modulador de calcio citosólico que actúa como tamponador del mismo (122).

Las proteínas S100, a concentraciones intracelulares fisiológicas de Ca^{2+} , mantienen una estructura conformacional plegada prácticamente hidrofílica y no interaccionan con el Ca^{2+} . El incremento del Ca^{2+} a nivel intracelular, bien por liberación desde el retículo endoplasmático, bien por entrada del mismo desde el torrente sanguíneo a través de los canales de Ca^{2+} , conlleva una unión de la proteína S100 a este catión. Esta unión provoca un cambio conformacional en la proteína, de modo que van a quedar expuestos sitios hidrofóbicos de interacción con otras proteínas (123).

En cuanto al mecanismo de acción de la proteína S100 a nivel extracelular será distinto, pues cuando ésta es liberada de la célula tiene todos sus sitios de unión a Ca^{2+} ocupados. Estos otros mecanismos de acción pueden basarse en la capacidad de las proteínas S100 para oligomerizar o para unirse a iones de Zn^{2+} y Mn^{2+} . Así por ejemplo la interacción de la proteína S100B con la proteína TAU es independiente de Ca^{2+} y dependiente de Zn^{2+} . La S100B inhibe la fosforilación de la proteína TAU mediada por la proteína kinasa II (124).

A excepción de la S100G, que es monomérica, las demás proteínas de esta familia aparecen en forma dimérica (la mayoría de ellas homodímeros y otras heterodímeros). Algunas incluso son liberadas en formas oligoméricas (125).

3.7.2. Proteína S100B

La proteína S100B fue la primera de la familia S100 en ser identificada. Fue descubierta por Michetti et al. en 1979, quien detectó la proteína en LCR de pacientes con esclerosis múltiple (126). Desde entonces empezó a considerarse la S100B como un biomarcador de daño cerebral (127). No hace referencia a una proteína en concreto, sino a todos aquellos dímeros de S100 que presentan una subunidad B en su estructura. Esos dímeros coinciden en el peso molecular: 21 kDa. La S100B circulante está constituida en su mayoría por un homodímero de subunidades B, aunque también existe el heterodímero S100 A1B (128). Estas dos subunidades presentan localizaciones distintas (y por lo tanto la presentan las isoformas de S100B): la subunidad B es más abundante en células astrogliales y células de Schwann, pero también aparece en adipocitos, condrocitos y melanocitos. La subunidad A1 aparece en forma de homodímero S100 A1A1 en músculo estriado, corazón y riñones, mientras que el heterodímero S100A1B aparece en células gliales (129).

La proteína S100B presenta una vida media corta (30-60 minutos) y un aclaramiento renal de unas dos horas. Esto hace pensar que cualquier elevación sostenida en los niveles de S100B será debida a una excreción activa de dicha proteína o secreción pasiva por parte de tejidos dañados (130, 131).

Como ya hemos dicho, la proteína S100B es muy característica del SNC, pero no exclusiva. A pesar de ello se la considera como un marcador de daño glial. Dada su elevada expresión a este nivel, su expresión se ve alterada en diversas enfermedades neurodegenerativas (132).

3.7.2.1. Propiedades de la S100B

Las funciones intracelulares de esta proteína son radicalmente diferentes de sus efectos extracelulares, presentando una dualidad según su localización intra o extracelular (122, 133).

Acciones intracelulares

A nivel intracelular actúa a través de la unión a Ca^{2+} como regulador de múltiples funciones: fosforilación y degradación de proteínas, motilidad y deformación celular, proliferación y diferenciación celular, comunicación intercelular, homeostasis del Ca^{2+} , transcripción y regulación de receptores (134). Un incremento en la producción de S100B supondrá una activación de los sistemas productores de energía intracelulares, como lo son la glucólisis y la glucogenolisis (135).

La regulación de la concentración intracelular de S100B se vuelve muy importante durante el proceso de neurogénesis. Las células progenitoras neuronales

presentan una concentración de S100B relativamente elevada, pues necesitan a la proteína S100B para mantener su estado de célula indiferenciada así como su capacidad migratoria. Estas células van a mantener esta concentración durante el proceso de proliferación y migración, pero disminuye la expresión de la proteína durante la diferenciación de la célula a precursor glial, hasta de nuevo restaurar los niveles de S100B en el astrocito ya diferenciado (136, 137). En esta célula diferenciada regulará las funciones descritas anteriormente (122).

Acciones extracelulares

En condiciones fisiológicas se produce una liberación continua de proteína S100B desde el interior al exterior de los astrocitos (125). La concentración de S100B a nivel del cerebro es de unos 10-20 μM . La mayor parte de esa proteína liberada al espacio extracelular no se va a quedar en dicho espacio, si no que va a migrar al LCR, de modo que la concentración de proteína S100B en el espacio extracelular ronda la concentración nM. Sin embargo, ante una situación patológica, bien sea por daño o por necrosis astrocitaria, se producirá un incremento en dicha concentración, debido a la combinación de una liberación pasiva desde el interior celular, defectos en la eliminación de la proteína como consecuencia del daño inflamatorio, así como por inducción de iones Ca^{2+} a formar oligómeros de S100B que provocarán la adhesión de la proteína a la matriz extracelular (138, 139).

A nivel extracelular actúa como señal neuromoduladora, de modo que va a mediar interacciones entre células gliales entre sí y entre células gliales y neuronas. Estos efectos se deben en parte a su interacción con el receptor de productos avanzados de la glicosilación (RAGE), receptor multiligando perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (140). Este receptor transduce los efectos de la proteína a las células endoteliales y la microglía (141) tanto el efecto neurotrófico (vía Ras/MEK/ERK/NF- κ B/Bcl-2 y Ras/Cdc42-Rac1) como su efecto apoptótico (por la

hiperactivación de la ruta Ras/MEK/ERK) y la consecuente sobreproducción de ROS (142). La presencia de S100B extracelular va a afectar a todas aquellas células que presenten en su superficie RAGE, y la actividad de dicha proteína dependerá de la concentración de sus receptores, así como del grado de funcionalidad de los mismos. Para que se produzcan los efectos neurotóxicos y proinflamatorios de la S100B extracelular debe darse una interacción de oligómeros de S100B con oligómeros de RAGE (122).

En condiciones fisiológicas, dada la baja concentración de S100B extracelular así como de sus receptores RAGE, esta proteína no presentará efecto ninguno sobre la microglía. Pero al aumentar su concentración (como consecuencia de un daño neuronal), la proteína va a ejercer un efecto quimiotáctico sobre la microglía, activando la misma y favoreciendo la expresión de receptores RAGE en su superficie. Todo este proceso hará que la proteína S100B pase de ser un factor neurotrófico a ser un factor proinflamatorio (143). Cabe señalar que esta activación de la microglía no ha de ser necesariamente deletérea para el SNC. En condiciones fisiológicas, la microglía es la encargada de mantener la homeostasis del tejido cerebral. En el caso de ligeros incrementos en la concentración de S100B extracelular (como sería el caso de un daño cerebral leve) la proteína activaría dicha microglía favoreciendo la reparación del tejido dañado (144, 145).

La proteína S100B extracelular genera un aumento en la concentración de ROS por activación del complejo NADPH oxidasa de monocitos, lo que a su vez va a activar la producción de IL-1 β , TNF- α , Ciclooxigenasa-2 (COX2) y NOS (142, 146). Además, la proteína S100B extracelular va a aumentar la producción de óxido nítrico (NO) por parte de la microglía en presencia de cofactores, bien sea una endotoxina bacteriana o la citoquina IFN- γ (147, 148). Los receptores RAGE formarán oligómeros que interaccionarán con la S100B extracelular favoreciendo la agregación y concentración de la misma en la superficie de la microglía, permitiendo de este modo que la proteína

interacción con el IFN- γ y potencia su efecto proinflamatorio. De este modo la proteína S100B formaría parte de la cascada neuroinflamatoria (122).

La proteína S100B muestra un comportamiento concentración-dependiente. Así pues, en condiciones fisiológicas ronda una concentración nM y actúa como un factor neurotrópico (122), protegiendo a las neuronas de la apoptosis (149-151), estimulando el crecimiento de las neuritas (152-157), así como la proliferación de los astrocitos(158).

Existen estudios que demuestran que la infusión intraventricular de bajas dosis de S100B induce la neurogénesis a nivel del hipocampo, lo que mejora las funciones cognitivas tras un TCE inducido en un modelo experimental (159, 160). Los efectos neuroprotectores de la S100B los ejercerá también de forma indirecta, a través de proteínas que estimulan la captación del glutamato (agente neurotóxico) por parte de los astrocitos (161), disminuyendo la activación neurotóxica dependiente de la microglía y astrocitos (162), protegiendo a las neuronas de la neurotoxicidad por el péptido β -amiloide (163) y reduciendo la citotoxicidad que sufren las neuronas y la glía bajo condiciones de hipotermia (164).

Por contra, cuando hay daño o necrosis en astrocitos, la concentración de S100B aumenta a los μ M o sub μ M, debido a la liberación pasiva de la S100B intracelular, actuando como un agente neurotóxico y provocando apoptosis neuronal, mediante vía directa o indirecta mediante los mecanismos previamente descritos (165-167).

3.7.2.2. Localizaciones de la proteína S100B

Proteína S100B en suero

La proteína S100B se sintetiza fundamentalmente en los podocitos de los astrocitos, prolongaciones celulares que están en contacto con los vasos sanguíneos. Cuando se produce una disrupción de la BHE, esta proteína va a pasar inmediatamente al torrente sanguíneo (168, 169). Así en condiciones fisiológicas, la concentración de S100B en suero es mínima. Pero cuando se produce un daño neuronal o lesión de la BHE, dicha concentración se verá incrementada, al igual que se verá incrementada la concentración en LCR. Estas lesiones neuronales/cerebrales no han de ser de elevada gravedad para que la concentración de S100B se vea incrementada, pues existen estudios que han probado la elevación de la proteína S100B en suero como consecuencia de actividades que implican movimientos repetitivos, sacudidas o impactos en la cabeza, como pueden ser correr, practicar boxeo, hockey o baloncesto (131, 170). Estos estudios indican que no sólo en condiciones de disrupción de la BHE se libera proteína S100B al torrente sanguíneo, pues no se daría dicha disrupción como consecuencia de practicar dichas actividades físicas o deportivas, pero sí una activación astrogliar e incluso destrucción de la misma. En esta situación también se liberaría S100B a la circulación.

Pero no sólo como consecuencia de un daño cerebral se detecta la proteína S100B en suero, sino que existen localizaciones extracraneales donde también puede ser sintetizada. Existen múltiples estudios que prueban la síntesis de esta proteína en tejidos extracraneales. Durante la tipificación de la proteína en los años 80 se describieron como ubicaciones extracraneales el músculo esquelético, la piel y la grasa parda y blanca (171, 172). A pesar de ello, Korfiás et al. publican en 2006 una revisión sobre la proteína S100B donde remarca que las causas extracraneales presentan una mínima contribución a la elevación de la proteína S100B sérica (173).

Los niveles de S100B se han demostrado elevados en procesos relacionados con daño a nivel cerebral tales como: eventos hipóxico-isquémicos, accidentes cerebrovasculares, enfermedades neurodegenerativas, tumorales, trastornos psiquiátricos, enfermedades infecciosas del SNC y procesos traumáticos. Pero también se han observado incrementos de este biomarcador en situaciones de fracturas óseas, laceraciones, infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y/o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (148, 174, 175). Además el análisis de los niveles séricos de S100B resulta de utilidad para la detección y seguimiento de tumores tipo melanoma.

Proteína S100B en orina

La proteína S100B se elimina vía renal, con un aclaramiento de unas dos horas (130). Existe poca información sobre la utilidad de la determinación de los niveles de S100B en orina, y la mayoría de los estudios en base a dichos niveles han sido realizados en población pediátrica.

Gazzolo et al. han realizado varios estudios en recién nacidos y prematuros, los cuáles presentaron complicaciones neurológicas graves tales como desarrollo de hemorragia intraventricular y encefalopatía hipóxico isquémica, como consecuencia de haber sufrido hipoxemia. Estos pacientes presentaron unos niveles de S100B en orina anormalmente elevados en un periodo de tiempo inferior a 96 horas tras el nacimiento (176-181).

Por otra parte, Berger et al. estudiaron los niveles de S100B tanto en suero como en orina en niños que habían sufrido un TCE (182). Encontraron un aumento de los niveles séricos y urinarios de S100B en estos niños con respecto a los controles, presentando un pico de concentración en suero previo al presentado en orina, lo que justifica la utilidad de la determinación de este biomarcador en orina en aquellos

pacientes que no acuden al hospital hasta transcurridas varias horas tras el accidente, hecho muy frecuente en población pediátrica que sufre malos tratos o en pacientes que sufren un TCE leve.

En 2009, Schültke et al. realizaron un estudio en población adulta, con objeto de evaluar el papel de la concentración de la proteína S100B en orina, como indicador de daño cerebral tras un TCE de distinta gravedad (leve, moderado y grave) (183). Los investigadores analizaron los niveles de S100B, tanto en suero como en orina, en el momento del ingreso y a las 96 horas del traumatismo. Los resultados mostraron la existencia de una correlación negativa entre los niveles de la proteína S100B en orina y la puntuación alcanzada en la GCS en el momento del ingreso en el grupo de pacientes con TCE moderado, no así en los pacientes con TCE leve ni TCE grave. En relación a las muestras de suero, dicha correlación se demostró en todos los grupos de pacientes estudiados.

Proteína S100B en LCR

La utilidad de la proteína S100B como marcador de daño neuronal fue descrita por primera vez en el LCR (126, 184). En los últimos años se han realizado estudios que han corroborado el papel de este biomarcador en LCR como indicador de distintos tipos de lesiones neuronales, tales como enfermedades neurodegenerativas, tumores cerebrales, TCE y enfermedades cerebrovasculares (185-187). Estos mismos resultados han sido confirmados en modelos animales (188).

Cabe destacar el hecho de que la proteína S100B en LCR presenta un gradiente de concentración decreciente desde los ventrículos hasta la médula ósea (189).

Proteína S100B en líquido amniótico

Han sido varios los grupos de investigación que han estudiado el papel de la proteína S100B en el fluido amniótico. La proteína pasaría de la circulación sanguínea fetal al líquido amniótico, y por lo tanto sería reflejo del estado del feto. Por ejemplo en casos de fetos anencefálicos o con espina bífida, así como en situaciones de muerte fetal, se puede detectar la proteína S100B en el líquido amniótico (190, 191).

El gen que codifica la proteína S100B se encuentra en el brazo largo del cromosoma 21, cromosoma que está implicado en la trisomía 21 o Síndrome de Down. Varios investigadores han comprobado que, en aquellos fetos portadores de la trisomía 21, se produce un aumento de la concentración de S100B en líquido amniótico (192-194).

3.7.2.3. Aplicaciones de la S100B en la práctica clínica

Enfermedades neurológicas

Dado que la proteína S100B se sintetiza de forma mayoritaria en las células astrocíticas, un incremento en sus niveles de expresión es indicativo de una activación de dichas células. Los efectos autocrinos de la S100B sobre los propios astrocitos (regulación positiva de la expresión de citoquinas como IL-6 e TNF- α) están mediados por su interacción con receptores RAGE. El aumento en la secreción de S100B es una de las respuestas que se producen en primer término tras la generación del daño metabólico en astrocitos y células gliales (195).

En 2008, Murabayashi et al. realizaron un estudio con recién nacidos que sufrieron asfixia perinatal, y demostraron que un incremento en los niveles séricos de

S100B indica, con una elevada probabilidad, la presencia de encefalopatía hipóxico-isquémica (196). Además se ha observado que aparecen niveles más altos de S100B en sangre de cordón umbilical de neonatos con acidosis y patrones patológicos en la cardiotocografía y electrocardiografía fetal realizadas durante el parto (197).

En otra patología en la que aparecen alterados los niveles de S100B es en la HSA. Los niveles de este biomarcador presentan una correlación positiva con la gravedad de la enfermedad diagnosticada según las evidencias clínicas y hallazgos en técnicas de neuroimagen (198).

En el caso del Alzheimer se produce una liberación masiva de S100B por parte de los tejidos necróticos. Este incremento en la concentración de S100B contribuirá al proceso de neurodegeneración y apoptosis (199-201).

Otra posible aplicación de los niveles séricos de S100B se presenta en pacientes que han sufrido un ictus isquémico. Una concentración sérica elevada de S100B en este tipo de pacientes antes de empezar una terapia trombolítica (con activador tisular del plasminógeno) constituye un factor de riesgo independiente para una complicación hemorrágica intracerebral. A pesar de ello, la exactitud diagnóstica es muy baja como para utilizar la proteína S100B como biomarcador de este tipo de accidentes en la práctica clínica (202).

Resulta interesante el hecho de que en la esclerosis lateral amiotrófica, los niveles de S100B se ven disminuidos, mientras que se produce un incremento en la concentración de la proteína S100A6 (203, 204). En el caso de la esclerosis múltiple, no se han encontrado aumentos de los niveles séricos de S100B, pero sí de la concentración de dicha proteína en LCR (205, 206).

También se han encontrado alteraciones en los niveles de S100B en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico que presentan desórdenes neuropsiquiátricos (como convulsiones, accidente cerebro vascular, psicosis...), así como en el síndrome de apnea obstructiva del sueño, todas ellas situaciones en las que se traduce que se está produciendo un daño neurológico (207-209).

Otro estímulo capaz de incrementar la producción de S100B es una situación de hiperamonemia. El incremento en los niveles de S100B en este tipo de pacientes contribuirá a generar el daño cerebral característico de la encefalopatía por insuficiencia hepática (210).

También en los trastornos psiquiátricos se ven alterados los niveles de S100B en suero. Rothermundt et al. demostraron una correlación positiva entre los niveles séricos de S100B y el grado de depresión de los pacientes (211). Por otra parte, aquellos pacientes que estaban en tratamiento con antidepresivos presentaban unos niveles de S100B en suero inferiores que los presentados por pacientes no tratados con dichos fármacos. Finalmente, en las exacerbaciones del trastorno bipolar (episodios de manía y depresión) se observa un incremento de los niveles séricos de S100B, de modo que la concentración de este biomarcador desciende hasta la normalidad en las fases de remisión de la enfermedad (212).

Enfermedades neoplásicas

Los procesos cancerígenos son capaces de alterar los patrones de liberación de distintas proteínas de la familia S100, tales como S100B, S100A2, S100A4, S100A6 y S100P (213). La vía de señalización S100-RAGE juega un papel muy importante en la supervivencia de las células tumorales y progresión de la enfermedad. Los tumores deficientes de RAGE se caracterizan por presentar una apoptosis acelerada y una disminución de la activación de NFκB. En el caso de S100A4 y S100B, estas proteínas

van a interactuar con el producto del gen supresor de tumores p53, inhibiendo su fosforilación, de manera que provocan una regulación negativa de la actividad de p53 mediante un proceso dependiente de calcio (214, 215).

En el caso del melanoma maligno, se produce un incremento en la secreción de S100B proporcional al estadio y pronóstico del cáncer (216). Este biomarcador se utiliza como indicador de metástasis en los melanomas (217). Además la S100B se utiliza como marcador inmunohistoquímico para este mismo diagnóstico, y es capaz de proporcionar información sobre la proliferación, diferenciación, inmunomodulación y otros procesos relevantes en el desarrollo de la enfermedad (218).

En cuanto al diagnóstico de metástasis cerebrales, la S100B sérica presenta un buen valor predictivo negativo en comparación con los resultados radiológicos. Pero hay que ser precavidos a la hora de valorar estos resultados, pues la concentración sérica de este biomarcador será reflejo tanto de la presencia de procesos tumorales como de accidentes cerebrovasculares isquémicos independientes de procesos cancerígenos. Por ello habría que valorar la concentración de S100B junto con la de proApolipoproteína A1, para poder confirmar en base a unos marcadores bioquímicos la presencia de tumores metastásicos cerebrales (219).

Enfermedades cardiológicas

Son muchos los grupos de investigación que han estudiado los niveles séricos de S100B en pacientes sometidos a cirugía cardíaca, para valorar la disfunción cerebral que se produce como consecuencia de dicha intervención. Así, han podido demostrar que un aumento de los niveles de S100B se correlaciona con la presencia de infarto cerebral y con la extensión del tejido cerebral infartado tras los procedimientos quirúrgicos.

Se ha demostrado que la concentración de S100B sérica que presenta el paciente a partir de las 48 horas de la cirugía cardíaca es capaz de predecir la evolución a largo plazo, de modo que niveles elevados de este biomarcador se correlacionan con una menor supervivencia. Por el contrario no se ha encontrado una respuesta uniforme en cuanto a las concentraciones de S100B a las pocas horas de la intervención (2-8 horas), no pudiendo establecer una correlación con el deterioro cognitivo postoperatorio. Esta disparidad de resultados podría tener una posible explicación en las pérdidas de sangre que tienen lugar durante las primeras horas tras la cirugía (220).

En cuanto a la producción de la proteína S100B en el propio tejido cardiológico, los cardiomiocitos en condiciones fisiológicas no expresan S100B. Pero su expresión se va a activar en aquellos cardiomiocitos que sobreviven a un infarto. El factor activador de esta expresión serán las catecolaminas. En esta situación la S100B va a inhibir que los cardiomiocitos desarrollen una respuesta hipertrófica. El mecanismo de inhibición aún está por definir de forma concreta (221-223). Parece que la proteína S100B liberada por los cardiomiocitos necróticos va a actuar sobre los cardiomiocitos adyacentes, induciendo en ellos un proceso apoptótico. Esta activación de la apoptosis es dependiente de RAGE, quien fosforilará a ERK1/2 y p53, así como activará la expresión y actividad de la caspasa proapoptótica 3 y disminuirá la de Bcl-2 (224).

Pero como ya comentamos con anterioridad, la proteína S100B muestra un comportamiento concentración-dependiente. Y este comportamiento lo refleja no sólo en tejido cerebral, sino también en el muscular y cardiológico. Bajas concentraciones de S100B van a estimular la proliferación de los mioblastos, un acontecimiento crucial para el desarrollo y regeneración del músculo (225, 226).

Proteína S100B en traumatismo craneoencefálico

Como se ha descrito, esta proteína muestra una sensibilidad suficiente para identificar de forma precoz la lesión cerebral y su magnitud (227, 228). Estas características la encuadran como el posible marcador pronóstico cerebral que sirva de variable objetiva y medible en los pacientes con TCE, pudiendo reflejar de forma fidedigna su buena o mala evolución clínica (173, 229).

En una reciente revisión, Bloomfield et al. describieron que el grado de elevación de la proteína S100B resulta de utilidad para predecir el pronóstico tras un TCE. Encontraron que elevaciones de dicha proteína por encima de ciertos niveles era un marcador pronóstico de mortalidad, así como un valor normal de la misma podía mostrar ausencias significativas de lesión cerebral (230).

Traumatismo craneoencefálico leve

El TCE leve es el TCE que se produce con mayor frecuencia. La utilidad de la determinación de la proteína S100B para el diagnóstico de estos pacientes sería muy elevada, pues podría discernir entre aquellos pacientes que realmente necesitan someterse a una TAC y aquellos que no, dado que, por los bajos niveles de S100B que presentasen, no sería indicativo de que sufriesen lesiones intracraneales (231, 232).

En 2012, Egea-Guerrero et al., realizaron un estudio sobre una población de 143 pacientes con TCE leve (227). A todos ellos se les realizó una TAC a su ingreso, así como una extracción de sangre en las primeras 6 horas tras el accidente. En esa muestra de sangre se determinó la concentración de S100B. Los investigadores demostraron que aquellos pacientes que presentaban lesiones intracraneales en la TAC, presentaban niveles de S100B séricos mayores que los que no presentaban tales lesiones. Incluso podían determinar aquellos pacientes que, con un margen de

seguridad amplio, no serían subceptibles de someterse a la TAC de cráneo por presentar unos niveles de S100B en suero inferiores a 0,130 µg/L. Estos resultados se muestran de acuerdo con los publicados por Biberthaler et al., en 2006, quién estudio un total de 1.309 pacientes con TCE leve, y fijó el punto de corte para la concentración de la proteína S100B en 0,105 µg/L, obteniendo un 99% de sensibilidad y un 30% de especificidad (228). Sin embargo, el período ventana entre el TCE y la inclusión del paciente en este estudio multicéntrico, fue de tan solo 3 horas, lo cual podría restar utilidad a la prueba.

Traumatismo craneoencefálico grave

Varios autores coinciden en señalar la elevada capacidad predictora de lesión intracraneal que caracteriza a la proteína S100B (183, 230, 233). Algunos de sus trabajos han demostrado que la determinación de S100B, junto con las variables clínicas del paciente, puede predecir la evolución a ME (84, 85, 234). Además, una concentración sérica elevada se correlacionaría con el grado de extensión del daño cerebral según los resultados de técnicas de neuroimagen, así como con un pronóstico de muerte (83, 86, 235).

En 1999 Raabe et al., publicó sus resultados en relación al curso temporal de los niveles de la proteína S100B durante más de 10 días tras el TCE, encontrando una buena correlación entre la concentración de la misma y el mal pronóstico a los seis meses. Sin embargo, este estudio no demuestra la relación existente entre el pronóstico y los valores iniciales de la proteína, ni tampoco la posibilidad de definir entre buen y mal pronóstico (235).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La concentración de la proteína S100B, tanto en suero como en orina, es un marcador con capacidad pronóstica a corto/medio plazo en los pacientes que sufren un TCE grave.

OBJETIVOS

1. Evaluar la capacidad predictora de la proteína S100B en suero, durante las primeras horas de evolución tras el TCE grave, como marcador pronóstico de muerte encefálica.
2. Evaluar durante los primeros días de ingreso los niveles de la proteína S100B en suero y en orina en pacientes que han sufrido un TCE grave.
3. Estudiar la capacidad pronóstica sobre mortalidad global al mes del TCE de la proteína S100B en suero y orina.

III. MATERIAL Y MÉTODO

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo observacional desarrollado en pacientes con TCE grave ingresados en la Unidad de Neurocríticos del Hospital de Rehabilitación y Traumatología (HRT) del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, entre Mayo del 2009 y Mayo del 2012.

El Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla constituye en la actualidad el mayor complejo hospitalario del Sistema Sanitario Público de Andalucía y del Sistema Nacional de Salud, tanto por su intensa actividad asistencial, como por su infraestructura y dotación tecnológica. Dentro de este complejo hospitalario, se encuentra el HRT, uno de los principales centros de referencia para la patología neurotraumatológica existentes en España.

La Unidad de Cuidados Intensivos Neuroquirúrgicos consta de 22 camas monitorizadas, especialmente diseñadas y preparadas para la atención de estos pacientes. Se encuentra dividida en 3 subunidades clínicas atendiendo en una primera subunidad de 11 camas, fundamentalmente a los pacientes con TCE grave y grandes quemados; una segunda subunidad de 6 camas que atiende mayoritariamente a pacientes politraumatizados, que incluyen traumatismos torácicos, abdominales, faciales y ortopédicos graves junto con los traumatismos raquímedulares, y una tercera subunidad de 5 camas donde se asisten preferentemente a los pacientes con patología neuroquirúrgica y neurovascular.

2. UNIDAD DE ANÁLISIS.

Incluimos en el estudio, aquellos pacientes que ingresaron en la Unidad de Neurocríticos como consecuencia de un TCE grave, y que se ajustaban a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

1. Pacientes que han sufrido un TCE grave, definido mediante un GCS ≤ 8 tras la resucitación hemodinámica y metabólica, descartándose influencia farmacológica.
2. Pacientes mayores de 16 años.
3. Extracción de la primera muestra de suero dentro de las primeras 6 horas post- traumatismo.
4. Presencia de estabilidad hemodinámica, con una presión arterial media >75 mmHg, con o sin apoyo de drogas vasoactivas.
5. Que el representante legal autorizara y firmara el consentimiento informado para la inclusión del paciente en el estudio.

Criterios de exclusión:

Estos se basaron en los siguientes puntos:

1. Pacientes embarazadas.
2. Pacientes con historia de abusos de alcohol u otras drogas.
3. Parada Cardiorrespiratoria tras el TCE.
4. Insuficiencia renal crónica o aguda tras el traumatismo.
5. Politraumatizado múltiple con una evaluación según la *Abbreviated Injury Score* (AIS) > 5 en algún órgano diferente al encéfalo (66).

6. Presencia de antecedentes en la historia médica del paciente relacionados con la presencia de lesión histológica compatible con melanoma.

7. Presencia de otra serie de patologías previas concurrentes a nivel del Sistema Nervioso Central, que pudieran artefactar la evaluación del resultado final.

Se incluyeron durante el período de estudio un total de 140 pacientes en los cuales se determinaron los niveles serológicos de la proteína S100B durante las primeras 24 horas de ingreso. Durante los últimos 9 meses del estudio, con el fin de ampliar el conocimiento y la utilidad de este biomarcador, se decidió evaluar en esos últimos pacientes un curso temporal más extendido de los niveles de S100B (hasta las 96 horas), tanto en suero como en orina. En esta subpoblación de pacientes, se evaluó tanto la posible evolución a ME, como la situación funcional a los 30 días del accidente.

3. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Este estudio fue presentado al comité de ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío para su aprobación previo al inicio del mismo. Se generó una hoja de consentimiento informado específica que se entregó a los familiares de los pacientes para la toma de decisiones a efectos de inclusión en el estudio.

Se han seguido las recomendaciones para médicos en investigación bioquímica en las que participan seres humanos, según la Declaración de Helsinki (Adoptada en la 18 Asamblea Médica Mundial en 1964 en Helsinki, Finlandia, revisada en la 29 Asamblea Médica Mundial en 1975 en Tokio, Japón y en la 35 Asamblea Médica Mundial en Septiembre de 1989).

Confidencialidad:

Se ha mantenido la confidencialidad de los pacientes que tomaron parte en este estudio. Para ello cada paciente estaba identificado con un código constituido por 3 dígitos que hacía referencia al número de orden de inclusión en el estudio.

Información al paciente/representante legal:

Dado que todos los pacientes a incluir en el presente estudio presentaban un nivel de consciencia insuficiente, para poder ser informados, el/los representante/s legal/es de los pacientes, fueron informados de forma oral y por escrito de un modo comprensible, sobre los objetivos del mismo y los resultados que se pretendían obtener, así como que la participación en este estudio no conllevaba ningún tipo de riesgo adicional.

Fue necesaria la autorización escrita expresa, por ser un estudio en el que se obtuvieron muestras biológicas extraordinarias para análisis, no incluidas entre las habituales de la práctica clínica diaria.

4. VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

La información recogida fue la siguiente:

4.1 Variables demográficas

- Edad.
- Sexo.

4.2 Mecanismo lesional.

La gravedad de las lesiones extracraneales fue estimada en función de la Escala de Gravedad lesional o Injury Severity Score (ISS) (68).

4.3 Variables clínicas

- I. **Nivel de conciencia**, para cuya clasificación se empleó la Escala de Coma de Glasgow (GCS). [Tabla 2]

- II. **Examen pupilar:** al ingreso, evaluando el tamaño, simetría y reactividad a la luz de ambas pupilas.

- III. **Resultados de la TAC:** clasificados según la Traumatic Coma Data Bank (TCDB) o clasificación de Marshall (62). Se contemplaron seis posibilidades: [Tabla 1]
 - TCDB I, sin patología visible en el TAC.
 - TCDB II, cisternas presentes con desplazamientos de la línea media de 0-5 mm y/o lesiones densas presentes. Ausencia de lesiones de densidad alta o mixta $> 25 \text{ cm}^3$. Posibilidad de hallar fragmentos óseos y cuerpos extraños.
 - TCDB III, cisternas comprimidas o ausentes con desplazamiento de la línea media de 0-5 mm. Sin lesiones de densidad alta o mixta $> 25 \text{ cm}^3$.
 - TCDB IV, desplazamiento de la línea media $>5 \text{ mm}$. Sin lesiones de densidad alta o mixta $> 25 \text{ cm}^3$.
 - TCDB tipo masa evacuada, cualquier lesión evacuada quirúrgicamente.
 - TCDB tipo masa no evacuada; lesión de densidad alta o mixta $>25 \text{ cm}^3$ no evacuada quirúrgicamente.

- IV. **Presencia de otras lesiones asociadas al traumatismo.**

V. **Evolución a muerte encefálica.** El diagnóstico de muerte bajo criterios neurológicos se hizo siguiendo las indicaciones legales españolas y los requerimientos clínicos reconocidos internacionalmente. Confirmamos el diagnóstico como coma irreversible debido a causas estructurales, descartando previamente alteraciones por hipotensión, hipotermia, desequilibrios hidroelectrolíticos y metabólicos así como efectos de relajantes musculares, sedantes u otros fármacos que actúen a nivel de la placa neuromotora. Este diagnóstico se acompañaba de ausencia de respuesta motora, anisocoria, pupilas arreactivas, ausencia de reflejo corneal, ausencia de reflejo vestibular-ocular y cefálico-ocular, ausencia de reflejo de deglución, ausencia de tos ante un reflejo de succión traqueal, test de atropina negativo (incremento inferior a un 10% del ritmo basal tras la administración de 0,04 mg/kg de atropina IV) y ausencia de ritmo respiratorio a una presión parcial de dióxido de carbono arterial que se encuentra 60 mmHg o 20 mmHg por encima del valor normal (75).

Tras realizar el diagnóstico clínico de cada paciente, en el que se objetivaba la ausencia de actividad troncoencefálica, se realizaron pruebas de confirmación para establecer la ausencia de circulación cerebral o de actividad eléctrica del cerebro (236, 237). Cada paciente se sometió a un doppler transcraneal para confirmar los patrones sonográficos compatibles con la ausencia de circulación cerebral: separación onda diastólica-sistólica, flujo reverberante o ante la presencia de espigas sistólicas aisladas en arterias de la circulación anterior de forma bilateral y de la arteria basilar (238-240). En aquellos casos en los que no se detectó señal acústica, o en pacientes que no presentaban un cráneo hermético (por craneotomía, drenaje ventricular, amplia fractura craneal, etc.) se realizó un electroencefalograma (EEG). Los patrones electroencefalográficos se recogieron cada 30 minutos, con una amplificación de 2 μ V/mm y una frecuencia de banda fijada entre 0,3 Hz y 30 Hz. Los electrodos se posicionaron con una distancia mínima entre ellos de 10 cm, situados en el

cuero cabelludo en las regiones frontal, temporal, parietal y occipital. La ausencia de señal en el EEG confirmaba la ausencia de actividad cerebral eléctrica (241).

- VI. **Mortalidad global a los 30 días.** Durante la fase final del reclutamiento, se evaluó en los últimos 55 pacientes la evolución que habían presentado al mes del traumatismo, clasificándose como supervivientes o muertos.

4.4 Manejo clínico y tratamiento de los pacientes.

Todos los pacientes fueron tratados siguiendo las guías de práctica clínica de la Brain Trauma Foundation, así como mediante los protocolos de manejo de la propia unidad de Neurotrauma (242, 243). Estos protocolos incluyen: control de la temperatura corporal, elevación de la cabecera de la cama, impedir la obstrucción del flujo de la venas yugulares, sedación apropiada, intubación orotraqueal, ventilación mecánica y una resucitación de volumen total para mantener un PPC igual o superior a 60-70 mmHg. Las lesiones que ocupaban más de 25 cm³ fueron evacuadas quirúrgicamente. Cuando la PIC superaba los 20 mmHg se comenzó con intervenciones terapéuticas, introduciendo un drenaje externo ventricular cuando fue posible, mantenimiento de una hipocapnia moderada (PaCO₂: 30-35 mmHg), incremento en los niveles de sedantes hasta alcanzar una sedación profunda, relajación muscular y uso de tratamiento hiperosmolar con manitol o infusiones hipertónicas de NaCl. Cuando la PIC no se encontraba por debajo del valor control a pesar de tomar estas medidas terapéuticas, se llevaban a cabo una serie de medidas terapéuticas secundarias: inducción de hipertensión arterial con noradrenalina, hiperventilación hasta alcanzar PaCO₂ por debajo de 30 mmHg controlado mediante monitorización de la PtiO₂ e infusión de una dosis elevada de barbitúricos. Si a pesar de estas medidas la PtiO₂ se mantenía por debajo de 15 mmHg y se hubiesen

descartado mediciones fallidas o artefactos que interfiriesen en las mismas, se aumentaba la PPC por encima de 70 mmHg con noradrenalina para mejorar la situación.

4.5. Determinación de la proteína S100B.

Se extrajeron muestras de suero de los pacientes tan pronto como fue posible en el momento del ingreso, aceptando un periodo ventana de 6 horas desde el momento del traumatismo, así como a las 24 horas de esa primera extracción. Dentro del estudio, se realizó un subanálisis con los últimos 55 pacientes reclutados, a los cuáles se les extrajeron muestras tanto de suero como de orina, cada 24 horas a partir de la primera extracción, hasta las 96 horas de evolución.

Las muestras, una vez extraídas, eran enviadas al laboratorio. Allí los sueros y la orina eran centrifugados a 3.500 rpm y 1.500 rpm durante 10 minutos, respectivamente. A continuación las muestras eran alicuotadas en criotubos, identificadas y congeladas en ultracongeladores de -80°C hasta el momento de su análisis. La identificación de las muestras consistió en un código alfanumérico: en primer lugar una letra que identificaba la naturaleza de la muestra (S: suero, O: orina), a continuación los tres dígitos identificativos del paciente (según inclusión en el estudio), y finalmente una letra que indicaba el día de evolución del paciente (A-F).

La cuantificación de los niveles de S100B ($\mu\text{g/L}$) se realizó mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), para lo cuál se utilizó el kit comercial Elecsys 2010 immunoassaysystem (Roche Diagnostics, Germany). Este test es capaz de cuantificar los dímeros S100AB así como S100BB. Sigue una técnica tipo sándwich la cuál tiene una duración total de 18 minutos y requiere un volumen de muestra de 20 μL . El intervalo de medición es de 0,005-39 $\mu\text{g/L}$. Los valores inferiores

al límite de detección se indicaron como $<0,005 \mu\text{g/L}$ y los superiores fueron diluidos hasta obtener un valor cuantitativo (en ningún caso fue necesario). Los estudios de repetitividad y precisión intermedia de la técnica muestran una desviación estándar $<0,056 \mu\text{g/L}$ y un coeficiente de variación $<2,8\%$.

En las muestras de orina, además de cuantificar la concentración de proteína S100B, se les midió la concentración de creatinina, con objeto de descartar posibles efectos de dilución (244).

A la hora de realizar las determinaciones analíticas, la persona encargada de tal acción desconocía la situación clínica de cada paciente, así como los resultados de pruebas radiológicas y el pronóstico de cada uno.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Análisis Exploratorio de datos.

En primer lugar se realizó una exploración de los datos, generando estadísticos de resumen y representaciones gráficas para todos los casos y de forma separada, para grupos de casos. Este procedimiento se utilizó para identificar valores atípicos y caracterizar diferencias entre subpoblaciones (grupos de casos), y puede mostrar la existencia de valores inusuales o extremos en las observaciones.

Análisis Descriptivo.

Las variables numéricas se resumen con medias y desviaciones típicas o, en caso de distribuciones muy asimétricas, medianas y percentiles (P25 y P75), mientras que las variables no numéricas con frecuencias y porcentajes. Estas medidas se

calcularon globalmente y para grupos de casos. La descripción de la muestra se completa con distintas representaciones gráficas según el tipo de información (numérica/ no numérica). Se obtienen estimadores puntuales e intervalos de confianza al 95% para los diferentes estadísticos.

Análisis Inferencial.

Para medir la relación lineal entre pares de variables numéricas (normalmente distribuidas) se calcularon coeficientes de correlación de Pearson o Rho-Spearman según criterio de aplicación. Se aplicó el test de correlación o independencia para ver la significación de la asociación. Este análisis se realiza tanto en la muestra global como en los subgrupos definidos.

Para valorar la relación entre dos variables de tipo cualitativo, se realizaron tablas de contingencias y se aplicó el test de la Chi-cuadrado, Chi-cuadrado con corrección de continuidad o test exacto de Fisher (para tablas 2x2 poco pobladas) según criterios de aplicación. Los resultados significativos de estas pruebas de hipótesis se complementan con intervalos de confianza al 95% para diferencias de proporciones.

Para analizar la relación entre una variable cualitativa dicotómica y una cuantitativa se ha realizado el test de la t de Student una vez validado los requisitos de aleatoriedad, independencia, normalidad e igualdad de varianza. En el caso de no cumplirse el requisito de igualdad de varianza (test de Levene) se aplicó la t de Student con la corrección de Welch. Caso de no cumplirse el requisito de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) se realizó la prueba U- Mann Withney. En el caso de detectarse diferencias significativas, se determinan intervalos de confianza para diferencias de medias al 95% que cuantifican dichas diferencias.

Para la comparación de variables numéricas entre más de dos grupos (variable cualitativa Policotómica), una vez comprobados los supuestos de aleatoriedad, independencia de las observaciones, homocedasticidad y normalidad de las distribuciones, se realizó la prueba ANOVA (análisis de la varianza) o en su defecto Kruskal-Wallis. En caso de encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subgrupos comparados se efectúan pruebas de comparación “a posteriori” (prueba de Bonferroni o U de Mann-Whitney según criterios de aplicación) con el nivel de significación corregido.

Para comparar la información de tipo cuantitativo en dos subgrupos de estudio se utilizó el test de comparación de medias t-Student o, en caso de que no cumplieran los requisitos de aplicación de ésta, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para analizar la relación entre variables de tipo cualitativo, se elaboraron tablas de contingencia y se aplicó el test Chi-cuadrado o, en su caso, el test exacto de Fisher (tablas 2x2 poco pobladas).

En el caso de más de dos subgrupos de estudio, se utilizó la prueba de ANOVA o el test de Kruskal-Wallis, según cumplieran o no, los requisitos de aplicación.

Los resultados significativos de estas pruebas de hipótesis se presentaron con intervalos de confianza al 95% para diferencias de medias o proporciones.

Análisis de Regresión Logística.

El modelo de regresión logística se aplicó para relacionar una variable dependiente dicotómica (muerto/superviviente) con un conjunto de variables independientes (factores predictivos). El método selecciona el mejor conjunto de variables predictoras del evento de entre aquellas variables que en el análisis univariante resultaron significativamente relacionadas con la variable dependiente a

un nivel de significación inferior a 0,15. Las variables incluidas en el modelo permiten establecer la probabilidad de ocurrencia de la variable dependiente dadas las características de las hipotéticas variables predictivas. Para las variables incluidas en el modelo se calculan la razón de las ventajas (odds ratio) y sus respectivos intervalos de confianza al 95%

Análisis de supervivencias.

Se efectúa un análisis de supervivencia univariado mediante curvas de Kaplan-Meier, en el que la variable dependiente (tiempo hasta que se produce la muerte), se trata de predecir a partir de las variables independientes principales del estudio. Se obtienen las probabilidades de supervivencia, la media y mediana de supervivencia y los cuartiles. Se generan estadísticos separados por grupo de estudio y se representan las funciones de supervivencia para cada uno de estos grupos.

El test Log-Rank se utiliza para comparar la igualdad de las distribuciones del tiempo de supervivencia entre los diferentes grupos.

La regresión de Cox (riesgo proporcional) se utiliza para crear modelos de tiempos de supervivencia incluyendo hipotéticas variables predictoras (covariables) tanto categóricas como continuas.

Se ha efectuado un modelo de supervivencia multivariado mediante Regresión de Cox de riesgos proporcionales una vez validados los requisitos de aplicación. Tras un análisis univariante previo que identificó aquellas variables relacionadas con el tiempo hasta que se produce la muerte. Con estas variables se realizó un análisis multivariante para la selección del modelo final. De esta forma, se examina la relación entre el tiempo hasta que se produce la muerte. y cada variable, controlando por el resto de variables incluidas en el modelo. En el análisis univariado previo al análisis

multivariante se ha considerado un nivel de significación de 0,15. Para las variables seleccionadas por el mismo se calculan hazard ratio e intervalos de confianza al 95%.

Curvas ROC

Este procedimiento permitió la clasificación de un individuo en uno de dos grupos, en base al valor de una determinada variable. A su vez, proporcionó como estadístico el área situada bajo la curva ROC (AUC) y una tabla con los puntos de coordenadas de dicha curva (falsos positivos y la sensibilidad), pudiendo así deducirse un punto de corte para la clasificación del paciente: aquel valor de la variable de contraste tal que un pequeño aumento de la sensibilidad ocasionaba un incremento considerable de la proporción de falsos positivos.

En todos los contrastes de hipótesis se ha considerado un nivel de significación de 0,05.

El análisis de los datos se realizó mediante el software estadístico: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (versión 20.0, Chicago, IL, USA).

.

IV. RESULTADOS

1. Datos demográficos

Un total de 146 pacientes ingresaron en nuestra unidad durante los 36 meses que duró el estudio. Cinco pacientes fueron excluidos debido a que en el momento de su entrada en la unidad de neurocríticos habían superado el periodo ventana establecido (más allá de 6 horas tras el TCE grave), y una familia reusó participar en el estudio y firmar el consentimiento informado. Finalmente fueron 140 pacientes los que cumplieron todos los criterios de inclusión.

Un 83,6% de los pacientes reclutados fueron hombres (n= 116). La edad media de estos pacientes fue de 35,6 años (Desviación estándar [DE] 15,3; Intervalo de Confianza [IC] 95%). En relación al mecanismo lesional, predominaron los TCE graves consecuencia de accidentes de circulación (60%, n=84). Los datos demográficos de estos 140 pacientes se encuentran recogidos en la tabla 5.

Variables demográficas	
Edad (años), media (DE) [IC 95%]	35,6 (15,3) [33.0-38.2]
Sexo, n (%)	
Hombres	116 (83,6)
Mujeres	24 (16,4)
Mecanismo lesional, n (%)	
Accidente de tráfico	84 (60.0)
Caída	35 (25.0)
Agresión	6 (4.3)
Atropello	8 (5.7)
Otros	7 (5.0)

Tabla 5. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.

2. Datos clínicos

En la tabla 6 se esquematizan los datos clínicos de los 140 pacientes que incluimos en el estudio.

En referencia al nivel de conciencia valorado mediante la GCS, la mayor proporción de ellos (56,4%) presentaron una puntuación comprendida entre 7 y 8 puntos, mientras que el resto presentó una puntuación inferior.

En cuanto a la respuesta fotomotora de los pacientes en el momento del ingreso, un 67,8% (n=95) mostraron pupilas isocóricas, mientras que el 23,6% (n=33) presentaron anisocoria y el resto (8,6%, n=12) midriasis bilateral arreactiva.

Cuarenta y cinco pacientes (32,1%) presentaron hipotensión arterial y desaturación pre-hospitalaria.

En relación a las lesiones extracraneales, constatamos que un 26,4% de los pacientes (n=37) sufrieron un TCE grave “puro”, sin otras lesiones asociadas.

Todos los pacientes mostraron lesiones en la TAC de cráneo en el momento del ingreso (TCDB I, n=0). Se detectó una clara predominancia de las lesiones tipo difusas (41,4%, n=58, TCDB II) y de las lesiones tipo masa evacuada (37,9% n=53).

El 11,4% de los pacientes (n=16) evolucionaron a ME. El diagnóstico de ME se alcanzó en el 50% de esos pacientes durante las primeras 48 horas tras el ingreso. Un 25% se diagnosticaron durante el primer día, y el otro 25% en los 7 días siguientes.

Variables clínicas	
GCS score al ingreso, n (%)	
3	22 (15.7)
4	10 (7.1)
5	13 (9.3)
6	16 (11.4)
7	44 (31.4)
8	35 (25.0)
Respuesta fotomotora*, n (%)	
Isocoria	95 (67.8)
Anisocoria	33 (23.6)
Midriasis bilateral	12 (8,6)
Hipotensión arterial /desaturación **, n (%)	45 (32.1)
TCE aislado (%)	37 (26.4)
TCDB, n (%)	
I (lesión difusa sin patología visible en la TAC)	0 (0)
II (lesión difusa)	58 (41.4)
III (lesión difusa y edema)	16 (11.4)
IV (lesión difusa y desplazamiento línea media)	5 (3.6)
Lesión evacuada quirúrgicamente)	53 (37.9)
Lesión no evacuada)	8 (5.7)
Muerte encefálica, n (%)	16 (11.4)

Tabla 6. Datos clínicos de los pacientes reclutados. *En el momento del ingreso y tras resucitación metabólica y hemodinámica. **Pre-hospitalaria.

Se analizaron las diferentes características de los pacientes en función de su evolución a ME o no, tras el TCE grave. En la tabla 7 se reflejan los resultados de este análisis.

MUERTE ENCEFÁLICA	NO	SÍ	<i>P</i>
Resultados, n (%)	124 (88,60)	16 (11,40)	
Edad media (DE)	35,32 (14,71)	37,88 (19,87)	0,883
IC 95%	32,71-37,94	27,29-48,46	
Sexo, n (%)			0,999
Hombre	103 (83,06)	14 (87,50)	
Mujer	21 (16,93)	2 (12,50)	
ISS Mediana (RI)	30 (RI:25-38)	38 (RI:25-48)	0,209
Respuesta pupilar, n (%)			0,006
Isocoria	89 (72,70)	6 (37,50)	
Anisocoria	30 (23,40)	3 (18,80)	
Midriasis bilateral arreactiva	5 (3,90)	7 (43,80)	
Hipotensión arterial/desaturación*,n (%)	35 (29,03)	8 (50)	0,713
TCE puro, n (%)	30 (24,19)	7 (43,75)	0,227
GCS, Media (DE)	6,38 (2,11)	5,25 (1,88)	0,506
TCDB, n (%)			0,011
I-IV	74 (58,3)	5 (31,2)	
Evacuada	45 (37,5)	8 (50,0)	
No evacuada	5 (4,2)	3 (18,8)	
S100B al ingreso	0,309	0,683	<0,001
Mediana (RI)	(0,191-0,555)	(0,298-1,902)	
S100B a las 24h	0,213	0,474	<0,001
Mediana (RI)	(0,117-0,325)	(0,244-1,790)	

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes agrupados según la evolución a muerte encefálica o no. *Pre-hospitalaria. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

Aquellos pacientes que evolucionaron a ME presentaron una mayor incidencia de alteraciones en la respuesta fotomotora pupilar ($p=0,006$), así como presentaron una mayor proporción de lesiones intracraneales tipo masa (tanto evacuada como no evacuada) en la TAC del ingreso ($p=0,011$).

A su vez, los pacientes que sufrieron una evolución a ME presentaron mayores niveles de S100B en el momento del ingreso (0,683 $\mu\text{g/L}$; IR: 0,298-1,902), y a las 24 horas (0,474 $\mu\text{g/L}$; IR: 0,244-1,790), siendo dicha diferencia estadísticamente significativa con respecto a aquellos que no evolucionaron a ME ($p < 0,001$) [figura 3].

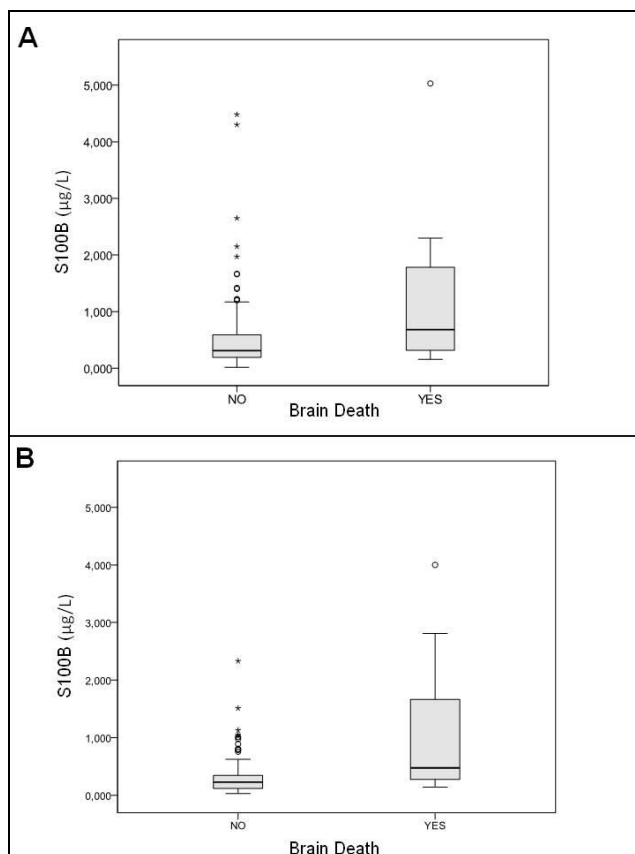


Figura 3. Gráfico de cajas y bigotes de los niveles de S100B ($\mu\text{g/L}$) en el momento del ingreso (A) y a las 24h tras la misma (B), en función de la evolución a muerte encefálica.

Las concentraciones de S100B, tanto al ingreso como a las 24 horas del mismo, se correlacionaron negativamente con el tiempo transcurrido desde el traumatismo hasta que se produjo el diagnóstico de ME ($r = -0,653$, $p = 0,006$; $r = -0,825$; $p < 0,001$; respectivamente).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de S100B tras agrupar a los pacientes en función de las siguientes variables: edad, sexo,

puntuación en la GCS al ingreso, puntuación alcanzada en el ISS al ingreso, hipotensión o desaturación pre-hospitalaria, y presencia de lesiones extracraneales asociadas al TCE.

3. Capacidad predictiva de evolución a ME de las distintas variables clínicas

El análisis de regresión múltiple univariante para determinar qué variables presentaban algún papel en la evolución de los pacientes a ME tras el TCE grave, nos mostró que la midriasis bilateral arreactiva alcanzó una Odds Ratio (OR) de 30,72 (IC 95%, 7,32-128,90; $p=0,001$). En cuanto a las lesiones tipo masa, la OR fue de 3,11 (IC 95%, 1,88-10,93; $p=0,007$) y 10,5 (IC 95%, 1,82-60,45; $p=0,008$) para las lesiones evacuadas y no evacuadas respectivamente.

Analizando los niveles del biomarcador S100B, objetivamos que por cada incremento de $1\mu\text{g/L}$ en los valores de S100B en suero al momento del ingreso, la OR para evolucionar a ME, era de 1,99 (IC 95%, 1,21-3,32; $p=0,008$). En referencia a la muestra de S100B de las 24 horas, la OR ascendía a 5,37 (IC 95%, 1,85-15,59; $p=0,002$). En relación a la puntuación en la GCS, por cada punto de disminución en la misma, existía una mayor probabilidad de evolución a ME (OR =1,34; [IC 95%, 1,08-1,77; $p=0,044$]) [tabla 8].

VARIABLES CLÍNICAS	OR (IC 95%)	P
Sexo	0,70 (0,14-3,31)	0,654
Edad	1,01 (0,97-1,04)	0,530
ISS	1,05 (1,01-1,09)	0,031
GCS*	1,34 (1,08-1,77)	0,044
Hipotensión **	2,44 (0,85-7,01)	0,096
Desaturación **	2,35 (0,82-6,73)	0,111
TCE puro	2,44 (0,84-7,10)	0,103
Midriasis bilateral arreactiva	30,72 (7,32-128,90)	0,001
TCDB tipo masa		
Evacuada	3,11 (1,88-10,93)	0,007
No evacuada	10,50 (1,82-60,45)	0,008
S100B		
Al ingreso	1,99 (1,21-3,32)	0,008
A las 24 h	5,37 (1,85-15,59)	0,002

Tabla 8. Análisis univariante de las variables clínicas que pueden influir en la evolución a muerte encefálica. *En el momento del ingreso y tras resucitación hemodinámica y metabólica.

**Pre-hospitalaria. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

Las variables determinadas como significativas en el análisis univariante, así como las consideradas clínicamente relevantes, fueron sometidas a análisis multivariante. Las variables incluidas fueron: puntuación en la GCS, ISS, desaturación e hipotensión pre-hospitalaria, hallazgos patológicos en la TAC, alteraciones en la

respuesta fotomotora y los niveles séricos de S100B. Las variables que permanecieron en el modelo fueron: midriasis bilateral arreactiva al ingreso (OR 21,35 [IC 95%, 5,50-82,54] $p=0,005$) y la concentración de S100B a las 24 horas (OR 4,90 [IC 95%, 1,43-16,72] $p=0,010$), con un AUC de 0,872 (IC 95%, 0,776-0,968; $p<0,001$).

Con objeto de examinar el papel de la S100B en el modelo, realizamos el análisis multivariante sin incluir los valores de S100B, y obtuvimos un AUC de 0,71 (IC 95%, 0,574-0,863; $p=0,008$). A pesar de presentar mayor AUC el modelo multivariante incluyendo la concentración de S100B, la diferencia entre los dos modelos no resultó clínicamente relevante.

Dada la fuerte asociación entre la midriasis bilateral arreactiva y la evolución a ME, desarrollamos un segundo modelo en el que incluimos sólo aquellos pacientes que presentaban una respuesta fotomotora conservada en al menos una pupila. En este análisis, la única variable que permaneció en el modelo fue la determinación de S100B a las 24 horas (OR 15.5 [IC 95%, 1,93-121,82] $p=0,009$; AUC 0,96 [IC 95%, 0,637-1,00], $p=0,001$) [tabla 9].

MODELO 1	Variable clínica	Midriasis bilateral arreactiva al ingreso	S100B a las 24h
	OR (IC 95%)	21.35 (5,50-82,54)	4,90 (1,43-16,72)
	p	0,005	0,010
	AUC (IC 95%)	0,872 (0,776-0,968)	
	p	< 0,001	
MODELO 2	Variable clínica	S100B a las 24h	
	OR (IC 95%)	15,5 (1,93-121,82)	
	p	0,009	
	AUC (IC 95%)	0.966 (0.637-1.00)	
	p	0,001	

Tabla 9. Análisis multivariante. Modelo 1. Todos los pacientes. Modelo 2. Pacientes con reflejo fotomotor en al menos una pupila.

4. Capacidad predictiva de evolución a muerte encefálica de la proteína S100B.

El análisis mediante curva ROC mostró que los valores de S100B en el momento del ingreso, así como a las 24 horas de la misma, podían predecir de una forma correcta la evolución a ME tras un TCE grave.

El AUC para la muestra del momento del ingreso fue de 0,71 (IC 95%, 0,56-0,85; p= 0,009), mientras que la muestra de las 24 horas alcanzó un AUC de 0,78 (IC 95%, 0,66-0,90, p <0,001) [figura 4].

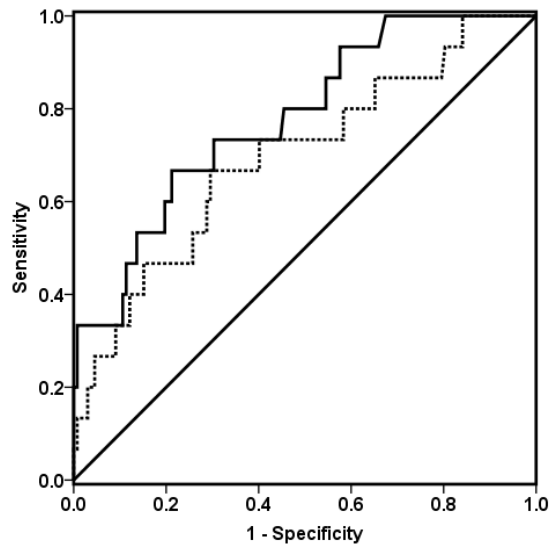


Figura 4 Análisis mediante curva ROC que compara la sensibilidad frente a la especificidad de la proteína S100B en suero para determinar la evolución a ME de los pacientes tras el TCE grave.

Como anteriormente ha sido expuesto, en el análisis multivariante se demostró que la midriasis bilateral arreactiva poseía la mayor capacidad pronóstica. Por ello, a la hora de realizar el análisis de la curva ROC seleccionamos aquellos pacientes que presentaron reflejo fotomotor en al menos una pupila en el momento del ingreso. La figura 6 muestra la capacidad discriminatoria de la proteína S100B, esquematizando el AUC resultante para cada determinación de S100B: 0,80 en el momento del ingreso (IC 95%, 0,66-0,94; $p=0,007$), y 0,86 para la segunda determinación, 24 horas tras el ingreso (IC 95%, 0,72-0,99; $p=0,001$) [figura 5].

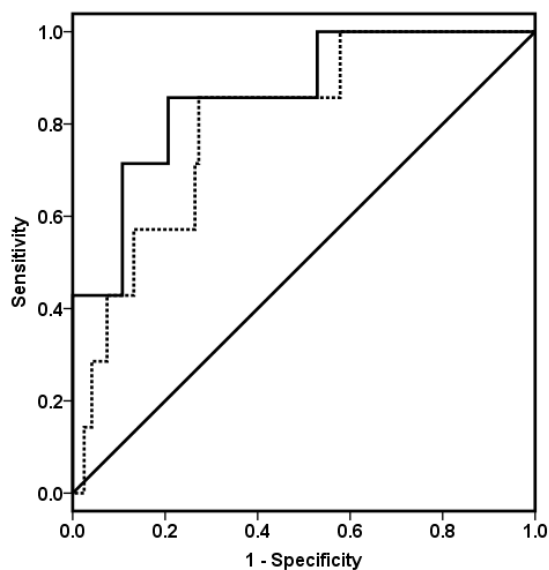


Figura 5. Análisis mediante curva ROC que compara la sensibilidad frente a la especificidad de la proteína S100B en suero para determinar la evolución a muerte encefálica en pacientes con TCE grave y presencia de reflejo fotomotor conservado en al menos una pupila en el momento del ingreso. Línea continua: niveles de S100B en el momento del ingreso. Línea discontinua: niveles de S100B a las 24 h post-TCE.

Dado que el análisis mediante curva ROC presentó una mayor AUC para la concentración de S100B en la muestra de las 24 horas para los pacientes con reflejo fotomotor conservado en al menos una pupila en el momento del ingreso, calculamos para dicha variable el punto de corte óptimo, de modo que consiguiéramos optimizar la relación entre sensibilidad y especificidad es decir, minimizar los falsos positivos y los falsos negativos. Dicho punto de corte fue establecido en 0,372 $\mu\text{g/L}$. A esta concentración, las propiedades diagnósticas de la S100B como predictor bioquímico de evolución a ME tras un TCE grave alcanzaban una sensibilidad del 85,7%, y un 79,3% de especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) fue de 18,7% y el valor predictivo negativo (VPN) de 98,9%. En la tabla 10 se refleja la distribución de esta subpoblación utilizando el punto de corte en la S100B de 0,372 $\mu\text{g/L}$.

Punto de corte ($\mu\text{g/L}$)	No ME	ME	Total n (%)
S100 B \leq 0.372	95	1	96 (75)
S100 B $>$ 0.372	26	6	32 (25)
Total	121	7	128 (100)

Tabla 10. Distribución de los pacientes con al menos una respuesta fotomotora conservada al ingreso, en función del punto de corte establecido.

5. Última fase del estudio: evolución de los niveles de S100B, en suero y en orina, a lo largo de las primeras 96 horas de evolución tras el traumatismo. Análisis de la mortalidad al mes del TCE.

En los últimos 15 meses de estudio, extendimos el seguimiento de los niveles de S100B hasta las 96 horas de evolución tras el traumatismo, completando el estudio con determinaciones en orina. En esta subpoblación de pacientes, evaluamos tanto la posible evolución a ME, como la mortalidad al mes del traumatismo.

Este grupo de pacientes (n=55) presentó un rango de edades comprendido entre los 16 y los 79 años, con una edad media de 37,6 años (DE 16,3). El 91,38% de esos pacientes fueron hombres (n=50). En cuanto al mecanismo lesional, cabe resaltar una clara predominancia de accidentes de tráfico (63,6%, n=35). En la tabla 11 se esquematizan las variables demográficas de estos pacientes.

Variables demográficas	
Edad (años), media (DE)	37,6 (16,3) [IC 95% 32,4-41,8]
Sexo, n (%)	
Hombres	50 (91,38)
Mujeres	5 (8,62)
Mecanismo lesional, n (%)	
Accidente de tráfico	35 (63,6)
Caída	8 (14,5)
Agresión	5 (9,1)
Atropello	4 (7,3)
Otros	3 (5,5)

Tabla 11. Características demográficas de los últimos 55 pacientes reclutados.

En cuanto a la clasificación de estos pacientes según el nivel de conciencia valorado con la GCS, un 63,6% presentaron una puntuación comprendida entre 7 y 8 puntos, mientras que un 36,4% presentaron una puntuación inferior.

En referencia a la valoración de la gravedad del traumatismo de aquellos pacientes que sufrieron traumatismos múltiples, ésta se evaluó según el ISS, alcanzando una puntuación media de 36,8, con una desviación estándar de 13,5 y un intervalo de confianza del 95%, comprendido entre 33,2 y 40,4.

De todos los pacientes englobados en este análisis, tan solo un 14,5% (n=8) presentaron un TCE grave aislado, es decir, no presentaron lesiones en otras localizaciones a nivel extracraneal.

En base a la clasificación tomográfica de Marshall, hubo una clara predominancia de los grupos de lesión difusa (61,8%), así como de lesión focal de alta densidad o mixta superior a 25 cc evacuada quirúrgicamente (23,6 %) (TCDB tipo II y lesión evacuada quirúrgicamente).

A la hora de evaluar el nivel de recuperación de los pacientes al mes del estudio y según la escala GOS, objetivamos que una mayoría de los pacientes presentaba un

buen resultado funcional, encontrándose un 50,9% de los pacientes (n=28) con una puntuación GOS comprendida entre 4 y 5. El 18,2% de los pacientes habían fallecido al mes del TCE grave, mientras que el 30,9% presentó una evolución a estado vegetativo o a una situación de incapacidad grave.

Un 23,6% de los pacientes (n=13) fueron sometidos intervenciones neuroquirúrgicas de urgencia, con objeto de evacuar hematomas intracraneales.

La tabla 12 recoge las características clínicas de este grupo de pacientes.

Variables clínicas	
GCS score al ingreso, n (%)	
3	9 (16.4)
4	1 (1.8)
5	6 (10.9)
6	4 (7.3)
7	23 (41.8)
8	12 (21.8)
ISS (DE)	36.8 (13.5) [CI 95% 33.2-40.4]
TCE aislado (%)	8 (14.5)
Neurocirugía (%)	13 (23,6)
TCDB, n (%)	
I (lesión difusa sin patología visible en la TAC)	0 (0)
II (lesión difusa)	34 (61.8)
III (lesión difusa y edema)	5 (9.1)
IV (lesión difusa y desplazamiento línea media)	1 (1.8)
Lesión evacuada quirúrgicamente	13 (23.6)
Lesión no evacuada	2 (3,6)
GOS al mes, n (%)	
1	10 (18,2)
2	6 (10,9)
3	11 (20)
4	14 (25,45)
5	14 (25,45)

Tabla 12. Datos clínicos de los últimos 55 pacientes reclutados

5.1. Evolución temporal de la proteína S100B en suero.

Tras el análisis de los niveles de la proteína S00B en suero a lo largo de las 96 horas de evolución, objetivamos que el pico de concentración de dicha proteína se encontraba en la primera determinación, presentando una diferencia estadísticamente significativa con respecto a todas las demás muestras ($p < 0,05$).

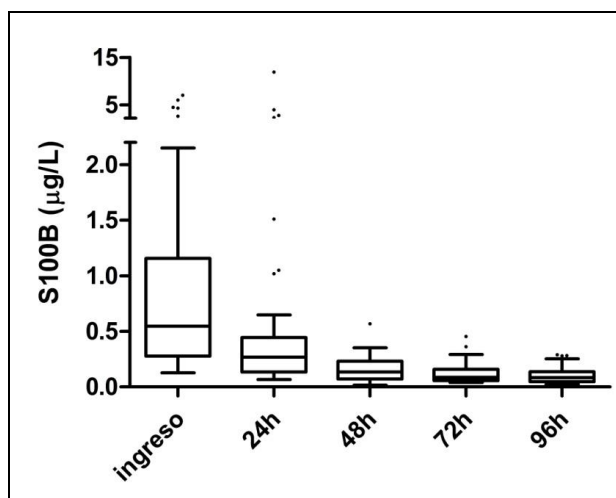


Figura 6. Cinética de la proteína S100B en suero tras el TCE grave (mediana, RI) ($p < 0,05$ entre cada muestra y la anterior y sucesiva).

A partir del momento del ingreso, los niveles séricos de S100B mostraron un descenso gradual hasta las 96 horas (última extracción analizada), siendo más acusada la caída de los niveles de las 0 a las 24 horas tras el TCE grave [figura 6]. En todos los casos, las muestras presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a aquellas extraídas antes o después de la misma ($p < 0,05$).

5.2. Evolución temporal de la proteína S100B en orina.

Del mismo modo que sucedió en el suero, la proteína S100B mostró un pico de concentración en orina en el momento del ingreso hospitalario. A partir de dicho momento, los niveles urinarios de S100B fueron disminuyendo paulatinamente hasta las 48 horas de evolución, momento a partir del cuál la concentración urinaria de dicha proteína sufrió un ligero incremento hasta las 96 horas tras el traumatismo. La diferencia encontrada entre las muestras de los distintos tiempos analizados fue estadísticamente significativa con respecto a la precedente y a la posterior ($p < 0,05$) [figura 7].

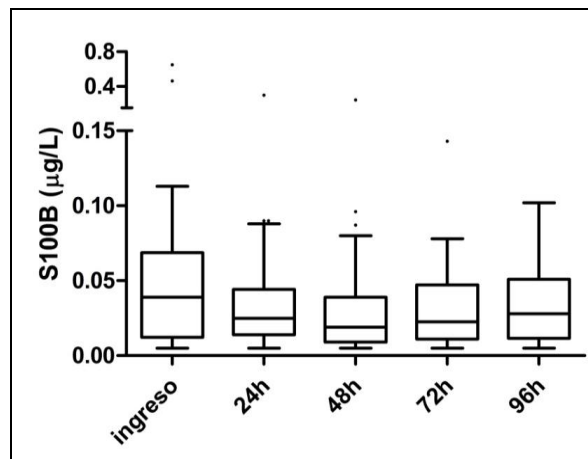


Figura 7. Cinética de la proteína S100B en orina tras el TCE grave (mediana, RI) ($p < 0,05$ entre cada muestra con la anterior y sucesiva).

No encontramos correlación entre los niveles séricos y urinarios de S100B en un mismo momento de extracción [tabla 13].

Correlación S100B suero-orina	n	r	p
Ingreso	52	0,154	0,276
24h	50	0,187	0,194
48h	46	- 0,061	0,689
72h	41	- 0,099	0,540
96h	14	0,220	0,450

Tabla 13. Análisis de correlación lineal mediante coeficiente Rho de Spearman entre los niveles de S100B en suero y en orina.

5.3. Relación de los niveles de S100B con la gravedad del TCE.

Con la finalidad de estudiar una posible relación entre los niveles de S100B, tanto en suero como en orina, con la gravedad del traumatismo, estudiamos la correlación existente entre los niveles de dicho biomarcador y la puntuación alcanzada en distintas escalas de valoración de la gravedad tras el TCE.

Encontramos una correlación negativa entre los niveles de S100B en suero y la puntuación alcanzada en la GCS ($r = -0,458$ en el momento del ingreso, $r = -0,487$ para la muestra de las 24 horas, con una $p < 0,01$ en ambos casos). Es decir, que a medida que disminuye el nivel de conciencia del paciente, o lo que es lo mismo, disminuye la puntuación en la GCS, aumentan los niveles de S100B, tanto séricos como urinarios.

Del mismo modo, analizamos la posible correlación entre los niveles de la proteína S100B y la puntuación alcanzada en el ISS. En este caso constatamos la existencia de una correlación positiva ($r = 0,493$ para la muestra sérica del momento del ingreso, $r = 0,466$ para la muestra de suero de las 24 horas, $p < 0,01$): a mayor gravedad del traumatismo, objetivada como mayor puntuación ISS, mayor concentración de S100B en suero y en orina.

5.4. Relación de los niveles de S100B en suero y en orina con la mortalidad.

Al estratificar a los pacientes en función de la mortalidad al mes del traumatismo, encontramos que los niveles de dicha proteína eran mayores, tanto en suero como en orina, en todos los momentos analizados en aquellos pacientes que no sobrevivieron al TCE grave. En relación a las muestras de suero, las que presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre fallecidos y supervivientes fueron las del momento del ingreso, a las 24 y a las 48 horas. En cuanto a las muestras de orina tan sólo la recogida a las 24 horas mostró una diferencia estadísticamente significativa.

Estos mismos resultados fueron obtenidos cuando analizamos el cociente S100B/creatinina en orina con respecto a la mortalidad. En la tabla 14 se presentan los valores medianos para cada grupo analizado, así como el nivel de significación. Para la realización de este abordaje tan sólo se pudieron analizar las muestras de los tres primeros días de evolución de los pacientes, es decir, hasta las 72 horas, dado que la mayoría de los pacientes que fallecieron lo hicieron antes de llegar al cuarto día de evolución.

	Suero			Orina		
	Supervivientes	Fallecidos	p	Supervivientes	Fallecidos	p
Ingreso	0,581 (0,283- 1,192)	0,906 (0,556- 2,420)	0,044	0,037 (0,012- 0,066)	0,034 (0,024- 0,072)	0,682
24h	0,290 (0,141- 0,567)	1,665 (0,558- 3,107)	0,000	0,023 (0,014- 0,045)	0,039 (0,028- 0,089)	0,012
48h	0,135 (0,071- 0,232)	0,245 (0,200- 0,567)	0,039	0,019 (0,009- 0,038)	0,031 (0,019- 0,040)	0,319
72h	0,830 (0,560- 0,158)	0,231 (0,075- 0,413)	0,171	0,022 (0,010- 0,045)	0,044 (0,003- 0,075)	0,594

Tabla 14. Medianas (RI) de los valores de S100B ($\mu\text{g/L}$) en suero y en orina, para los cuatro primeros días post-TCE. Los resultados significativos son marcados en negrita.

5.5. Análisis de la capacidad predictiva de las variables clínicas clásicas sobre la mortalidad al mes del traumatismo.

Las variables clínicas que mostraron capacidad predictiva sobre la mortalidad, considerada con un nivel de significación $<0,15$ en el análisis univariante fueron las siguientes: edad, ISS, baja puntuación GCS (considerado un GCS3-4), lesión tipo masa en la TAC y niveles de S100B en el momento del ingreso así como a las 24 horas (tanto en suero como en orina) [tabla 15].

	HR	IC 95%	p
GCS 3-4 *	4,583	1,269-16,548	0,020
Lesión tipo masa TCDB	9,785	2,073-46,180	0,004
S100B en suero al ingreso	1,391	1,043-1,855	0,025
S100B en suero a las 24h	1,297	1,115-1,509	0,001

Tabla 15. Análisis univariante de las variables clínicas que podrían influir en la mortalidad. * En el momento del ingreso tras resucitación metabólica y hemodinámica. Se muestran las variables cuyos resultados resultaron significativos.

Las variables que alcanzaron un nivel de significancia $<0,15$ en el análisis univariante, fueron incluidas en un modelo multivariante de análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Las variables que permanecieron en dicho modelo fueron las siguientes: puntuación GCS de 3-4 en el momento del ingreso, lesión tipo masa detectada en la TAC y los niveles séricos de S100B a las 24 horas del TCE. En la tabla 16 se muestran los resultados.

	HR	IC 95%	p
GCS 3-4 *	12,652	2,452-65,290	0,002
Lesión tipo masa TCDB	6,114	1,217-30,725	0,028
S100B en suero a las 24h	1,259	1,052-1,506	0,012

Tabla 16. Análisis multivariante de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Se muestran las variables que permanecieron en el modelo.

5.6. Capacidad predictora de mortalidad al mes del traumatismo de la proteína S100B en suero y en orina.

Se analizaron los niveles de la proteína S100B en suero y en orina a través de curvas ROC al ingreso, a las 24, 48 y 72 horas tras el traumatismo. El análisis a las 96 horas no se pudo realizar por falta de pacientes del grupo de fallecidos que sobreviviesen a dichas horas de evolución.

El análisis mediante curva ROC mostró que los niveles séricos de S100B en el momento del ingreso, a las 24 y 48 horas, podían discriminar entre pacientes que fallecieron dentro del primer mes tras el accidente y aquellos que sobrevivieron. En la tabla 17 se muestran las áreas bajo la curva (AUC) alcanzadas por cada una de las determinaciones, es decir, la capacidad pronóstica de predecir mortalidad de cada una de ellas.

	Suero			Orina		
	AUC	EE	p	AUC	EE	p
Ingreso	0,704	0,076	0,044	0,541	0,096	0,682
24h	0,958	0,028	<0,001	0,778	0,070	0,007
48h	0,858	0,072	0,039	0,651	0,094	0,319
72h	0,789	0,142	0,171	0,593	0,215	0,594

Tabla 17 Capacidad predictora de la proteína S100B mediante análisis de Curvas ROC. Error Estándar (EE). Los resultados significativos son marcados en negrita.

Los resultados reflejan que la muestra de suero que alcanzó una mayor AUC fue la de las 24 horas, por tanto fue la muestra sérica que mostró una mayor capacidad para predecir mortalidad al mes del TCE grave (AUC±EE. 0,958±0,028, p<0,001). En referencia a la orina, la muestra que presentó una mayor AUC fue, al igual que en el análisis de suero, la muestra de orina a las 24 horas (AUC±EE. 0,778±0,070, p=0,007).

Estos resultados quedan reflejados gráficamente en la figura 8. En ella podemos apreciar cómo la muestra de suero a las 24 horas alcanzó una mayor AUC que la muestra de orina a las mismas horas de evolución, lo que demuestra que la proteína S100B en suero a las 24 horas presentó una mayor capacidad predictora de muerte tras el TCE grave que en orina.

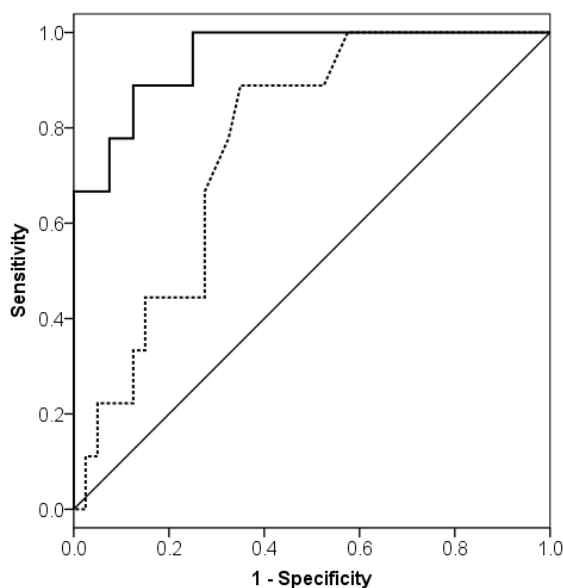


Figura 8. Curva ROC que compara sensibilidad frente a especificidad de la proteína S100B en suero y orina para predecir la mortalidad al mes del TCE grave. Línea continua: niveles de S100B en suero a las 24 h post-TCE. Línea discontinua: niveles de S100B en orina a las 24 h post-TCE .

Una vez objetivado que la muestra que presentaba mejor capacidad pronóstica de mortalidad al mes del accidente, era la de las 24 horas, tanto para suero como para orina, procedimos a establecer diferentes puntos de corte, seleccionando aquellos que presentasen una mejor relación sensibilidad/especificidad. De este modo, en nuestra serie, los puntos de corte se establecieron en 0,461 $\mu\text{g/L}$ para suero, y 0,025 $\mu\text{g/L}$ para orina.

Con objeto de determinar la exactitud de la proteína S100B como predictor de mortalidad al mes del TCE grave, aplicamos estos puntos de corte a nuestra población de estudio. Ambos puntos alcanzaron una sensibilidad del 90% y una especificidad del

88,4% y 62,8% en suero y orina, respectivamente, así como un VPN del 97,5% (suero) y 96,4% (orina), y un VPP del 60% en el caso del suero y algo más bajo, del 33,3%, en el caso de la orina. Estos resultados se esquematizan en la tabla 18.

Mortalidad					
S100B	Punto de corte (µg/L)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
Suero 24h	0,461	90	88,4	97,5	60
Orina 24h	0,025	90	62,8	96,4	33,3

Tabla 18. Resultado del análisis de las coordenadas de la curva ROC para la predicción de mortalidad (GOS=1). Selección de los mejores puntos de corte, en función de las características de la proteína S100B en suero y orina a las 24h.

5.7. Análisis de posibles interferencias en la valoración de los niveles de S100B.

a. Neurocirugía

El 23,64% de los pacientes (n=13) fueron sometidos a una intervención neuroquirúrgica de urgencia. Al analizar los niveles de S100B de los pacientes en función de haber sido sometidos a dicha intervención, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre un grupo y otro, tanto en suero como en orina [tabla 19].

	Suero			Orina		
	Sí NCG	No NCG	p	Sí NCG	No NCG	p
Ingreso	0,665 (0,341- 2,000)	0,568 (0,277- 1,158)	0,549	0,053 (0,024- 0,077)	0,037 (0,012- 0,061)	0,273
24h	0,290 (0,138- 0,484)	0,287 (0,139- 0,570)	0,960	0,017 (0,014- 0,032)	0,027 (0,013- 0,054)	0,488
48h	0,109 (0,081- 0,211)	0,150 (0,071- 0,239)	0,669	0,019 (0,005- 0,032)	0,019 (0,011- 0,043)	0,638
72h	0,098 (0,061- 0,153)	0,084 (0,053- 0,161)	0,829	0,028 (0,011- 0,059)	0,022 (0,009- 0,044)	0,542
96h	0,119 (0,048- 0,156)	0,082 (0,045- 0,135)	0,567	0,036 (0,015- 0,069)	0,028 (0,010- 0,050)	0,365

Tabla 19. Medianas (RI) de los valores de S100B ($\mu\text{g/L}$) en suero y en orina, agrupados los pacientes en función de haber sido sometidos a neurocirugía o no. NCG: Neurocirugía.

c. Politraumatismos

Agrupamos a los pacientes en función de que hubiesen sufrido traumatismos a otros niveles o no, es decir, enfrentando el grupo de pacientes que presentaba un TCE “puro” (14,55%, n=8) frente a aquellos politraumatizados (85,45%, n=47), para comparar la concentración de la proteína S100B en un grupo y en otro. A su vez, los pacientes politraumatizados fueron estratificados en función de las lesiones que presentasen, bien fueran fracturas en los miembros superiores y/o inferiores (n=15), o las presentarán en otras partes del cuerpo (n=32). La comparación de los niveles de S100B de ambos grupos de politraumatizados con respecto a los pacientes con TCE aislado, no alcanzó diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando enfrentamos los niveles de S100B de los pacientes que sufrieron fracturas en miembros, frente a los de los pacientes politraumatizados pero sin dichas fracturas, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,08$) en la primera

determinación de suero (ingreso), no así en las demás muestras. La tabla 20 esquematiza estos resultados.

	Suero			Orina		
	TCE puro	PLT	p	TCE puro	PLT	p
Ingreso	0,533 (0,390-0,732)	0,580 (0,276-1,220)	0,765	0,028 (0,012-0,064)	0,037 (0,012-0,063)	0,558
24h	0,292 (0,168-3,087)	0,268 (0,133-0,497)	0,450	0,025 (0,014-0,052)	0,023 (0,013-0,044)	0,742
48h	0,100 (0,039-0,117)	0,155 (0,078-0,245)	0,086	0,019 (0,012-0,034)	0,019 (0,009-0,043)	0,895
72h	0,080 (0,060-0,240)	0,084 (0,053-0,161)	0,907	0,023 (0,007-0,055)	0,022 (0,009-0,047)	0,931
96h	-	0,082 (0,046-0,134)	-	0,022 (0,010-0,066)	0,028 (0,011-0,050)	0,914

Tabla 20. Medianas (RI) de los valores de S100B ($\mu\text{g/L}$) en suero y en orina, agrupados los pacientes en función de haber sufrido un TCE aislado o acompañado de politraumatismo. PLT: Politraumatizado.

V. DISCUSIÓN

Nuestros resultados reflejan que la proteína S100B actúa como un biomarcador serológico con una adecuada capacidad predictiva, permitiéndonos identificar de forma precoz el riesgo que presentan los pacientes de evolucionar a ME tras un TCE grave. Además, mediante la ampliación de las determinaciones, tanto en suero como en orina, pudimos demostrar que la determinación de la S100B a las 24 horas del TCE, puede predecir la mortalidad global al mes del traumatismo.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que, durante las primeras 24 horas de ingreso tras sufrir un TCE grave, los pacientes que evolucionaron a ME presentaron unos niveles séricos de S100B superiores al resto. La capacidad predictora de este biomarcador mostró una mayor efectividad en aquellos pacientes que presentaron al ingreso al menos una respuesta fotomotora conservada en una de las dos pupilas, dado que su capacidad predictora en pacientes con midriasis bilateral arreactiva no superaba la capacidad predictiva de la propia variable clínica. Estos resultados pueden ser de utilidad para los equipos de trasplantes que podrán identificar aquellos pacientes susceptibles de evolucionar a ME tras un TCE grave de una forma objetiva y sencilla.

En relación al estudio del comportamiento de los niveles séricos y urinarios de la proteína S100B, pudimos objetivar que la concentración de la proteína S100B a las 24 horas de un TCE grave, tanto en suero como en orina, actúa como un predictor de mortalidad al mes del traumatismo. Concretamente, al comparar el tipo de fluido biológico donde realizábamos la medición de la proteína S100B, objetivamos que las determinaciones en suero presentaron una mayor capacidad predictiva que en la orina.

1. Papel de la proteína S100B como predictor de muerte encefálica

Los resultados de nuestro estudio, muestran que aquellos pacientes que evolucionaron a ME tras un TCE grave, presentaron unos niveles séricos de S100B mayores que aquellos que no presentaron dicha evolución.

Cuando analizamos el papel de las variables clínicas (edad, sexo, hipotensión arterial y desaturación prehospitalaria) y la evolución a ME, en ningún caso encontramos una correlación significativa con esta evolución. Sin embargo, sí pudimos objetivar la existencia de una correlación entre los niveles de S100B en el momento del ingreso, así como a las 24 horas después del mismo, junto con la puntuación alcanzada en la escala ISS, o las lesiones detectadas en la TAC de cráneo (evacuadas o no evacuadas), con la evolución posterior a ME. Por tanto, podemos afirmar que estas últimas variables sí que tendrían un papel relevante en la evolución de los pacientes a ME.

Nuestros resultados coinciden con los publicados por otros autores, que afirman que una puntuación baja en la GCS, aumenta la probabilidad de evolucionar a ME (94), así como estudios que indican que la presencia de midriasis bilateral arreactiva en el momento del ingreso, es un indicador de mal pronóstico (85). Quisiéramos remarcar, que los resultados de nuestro trabajo nos muestran que no existe asociación entre los niveles de S100B y la reactividad pupilar en el momento del ingreso, lo que podría sugerir el papel de la proteína S100B como variable predictora de ME por sí misma, independientemente del estado pupilar del paciente. Sin embargo, la capacidad pronóstica de este biomarcador en presencia de midriasis bilateral arreactiva, carece de relevancia clínica, pues en aquellos pacientes que no presentan fotorreactividad tras el TCE grave, esta variable es por sí sola la que predice la evolución a ME de una forma contundente. Este hecho hizo que centrásemos nuestra atención en aquellos pacientes que presentaban alguna respuesta fotomotora

en el momento del ingreso. En esta subpoblación, la determinación de la proteína S100B en suero a las 24 horas del traumatismo, se mostró como la única variable con una capacidad pronóstica adecuada para determinar la evolución de los pacientes a ME. Por último, subrayar que este subgrupo de pacientes en nuestra población supuso el 91,4% del total de TCE graves estudiados.

Coincidimos con otros autores en afirmar que los niveles de S100B séricos obtenidos después de las 12 horas del traumatismo, son más precisos que valores previos (234, 245). La explicación de esta afirmación se basa en que, una vez completada la fase de resucitación tras el TCE grave, los niveles de S100B reflejarán de forma más precisa el daño tisular inicial, la disrupción de la BHE, así como la cascada secundaria desencadenada tras el traumatismo. Esto apoyaría la capacidad pronóstica de la S100B a las 24 horas del traumatismo, donde el avance de la lesión secundaria perpetuaría la elevación de sus niveles en sangre.

Tras realizar una búsqueda exhaustiva en la bibliografía, tan sólo encontramos tres estudios basados en el análisis de la proteína S100B como herramienta predictora de ME (84, 85, 234). Dos de ellos son series de casos clínicos, de modo que presentan un número de pacientes muy reducido ($n=3$, $n=15$) (84, 234). En cualquier caso, ambos estudios demuestran que los niveles de S100B son mayores en aquellos pacientes que evolucionan a ME. La serie con mayor número de pacientes, hasta la fecha, es la presentada por Dimopoulou et al., la cual incluye 47 pacientes con TCE grave, y presenta los mismos resultados que los trabajos anteriores en cuanto a concentración de S100B y pronóstico de ME se refiere. Estos autores, reconocen como limitante del estudio, el bajo número de pacientes estudiados. Aún así, proponen la inclusión de este biomarcador, como técnica rutinaria de neuromonitorización. Bajo nuestro criterio, uno de los principales factores limitantes en el estudio de Dimopoulou et al., fue el protocolo seguido para el diagnóstico de ME, según el cual se basaron únicamente en la exploración clínica de muerte bajo criterios neurológicos, sin

desarrollar ningún test confirmatorio, lo cual a nuestro parecer resta fuerza a su trabajo (236). En este punto, quisiéramos destacar la importancia de diferenciar entre muerte cerebral y muerte encefálica (237). Para establecer este último diagnóstico resulta imprescindible la realización de un test instrumental junto con la exploración clínica que indique la ausencia de reflejos troncoencefálicos que permitan definir el fallecimiento del paciente bajo criterios neurológicos de forma completa.

Otro factor añadido que dificulta la comparación de los trabajos se basa en las técnicas de determinación de la proteína S100B. En la actualidad, los dos sistemas comercializados más extendidos para la realización de determinaciones de Pt-S100B en suero son: el Elecsys®S100 test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y el Liaison Sangtec ®100 system (DiaSorin S.p.A. Saluggia, VC, Italy). Ambos métodos no han presentado concordancias en las determinaciones de la proteína S100B cuando han sido estudiados, por lo que sus resultados no son equiparables (246, 247). Cabe resaltar, que esta diferencia en la forma de cuantificar las concentraciones de S100B, conlleva una dificultad a la hora de comparar los puntos de corte entre los trabajos relacionados con el TCE grave (84, 85, 229, 245, 248). Esta heterogeneidad ha sido ya manifestada previamente por otros autores (229, 249).

Hasta donde hemos podido saber, nuestra serie, con un total de 140 pacientes, es la más amplia encontrada en la literatura para el estudio del papel de la proteína S100B en el pronóstico de ME tras un TCE grave. De cualquier modo, nuestros resultados coinciden con los publicados hasta el momento: los pacientes con TCE grave que evolucionan a ME presentan unos niveles séricos de S100B superiores a los de los pacientes que no evolucionan a ME. Además, no sólo en suero se eleva la proteína S100B en aquellos pacientes que van a evolucionar a ME. En 2012, Böhmer et al., demostraron que dicho incremento también se observa en el LCR (187). Tomaron muestras de LCR de 20 pacientes que habían sufrido un TCE grave. Aquellos que evolucionaron a ME presentaron mayores niveles de S100B en LCR hasta el tercer día

de evolución. A pesar de la importancia de este descubrimiento, consideramos que la obtención de una muestra de LCR supone la inserción de un catéter intraventricular, técnica invasiva que no siempre ha de realizarse de forma rutinaria en el manejo de pacientes con TCE.

2. Comportamiento de la proteína S100B en suero

A lo largo de las últimas décadas se han desarrollado diversos estudios con el objeto de evaluar el papel de la proteína S100B en pacientes que han sufrido un TCE grave, como biomarcador pronóstico de mortalidad. La mayoría de estos estudios han evaluado la mortalidad a largo plazo, comprendiendo la misma periodos variables como el momento de la salida de la UCI (tiempo no bien determinado), al mes, a los 3 meses, a los 6 meses y al año (87, 102, 229, 245, 250, 251). Después de hacer una búsqueda exhaustiva en la bibliografía, tan sólo encontramos un estudio en el que se evaluase la tasa de mortalidad al mes del traumatismo (252). Dicho estudio fue realizado en 2007 por Korfiás et al., con una población de 112 pacientes con TCE grave. Los resultados de este estudio muestran que los niveles iniciales de la proteína S100B en suero de aquellos pacientes que sobrevivieron al cabo del mes del accidente, eran significativamente menores que los de los pacientes que fallecieron en dicho periodo. Los autores establecieron unos rangos de normalidad para la concentración sérica de S100B, basándose en las recomendaciones de la propia casa comercial, los cuales se encuentran establecidos para la determinación de lesión intracraneal en pacientes tras un TCE leve tras el estudio de Biberthaler et al., patología con poca similitud en relación a la gravedad que puede suponer un paciente con un GCS inferior a 8 sobre el que queremos desarrollar una estimación pronóstica (228). De este modo, consideraron niveles patológicos aquellos superiores a 0,5 µg/L; en el límite los que presentaban una concentración comprendida entre 0,15 y 0,5 µg/L; y normales los que poseían una concentración inferior a 0,15 µg/L. A pesar de que coincidimos con

Korfias et al. en el hecho de que los pacientes con TCE grave que evolucionan a un GOS=1 en el primer mes de evolución, presentan niveles séricos de S100B superiores a los de aquellos pacientes que sobreviven, no podemos comparar nuestros puntos de corte, pues hemos empleado métodos de análisis distintos para la determinación de la proteína S100B. Korfias et al. emplearon el método de Liaison Sangtec ®100 system (DiaSorinS.p.A. Saluggia, VC, Italy), mientras que nosotros utilizamos el Elecsys®S100 test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Como ya hemos resaltado anteriormente, estos métodos no resultan intercambiables, por lo tanto no comparables los valores absolutos (246, 247).

Otro estudio a reseñar es el llevado a cabo por Petzold et al., realizado sobre un grupo de 21 pacientes con lesión cerebral aguda. Hicieron un seguimiento de los niveles séricos de S100B, así como de otras variables clínicas, durante los primeros seis días de evolución. Los resultados de este estudio reflejan que la concentración media sérica de S100B en aquellos pacientes que fallecieron, era significativamente superior a la de aquellos pacientes con la misma patología pero que sobrevivieron (94). Esta diferencia queda reflejada de una forma similar en nuestros resultados, donde la concentración de proteína S100B de aquellos pacientes que fallecieron en el primer mes como consecuencia del traumatismo, se encontró en rangos superiores durante las primeras horas de ingreso, con respecto a los pacientes con TCE grave que sobrevivieron en dicho periodo.

3. Comportamiento de la proteína S100B en orina

A pesar de la amplia variedad de estudios realizados en base a la concentración de la proteína S100B en orina, nuestro estudio es el primero llevado a cabo sobre una población adulta, exclusivamente centrado en pacientes que sufren un TCE grave,

que prueba la efectividad pronóstica de dicho biomarcador en orina a corto plazo tras el TCE.

Los resultados de nuestro estudio revelan que, aquellos pacientes que habían fallecido al cabo del mes del traumatismo, presentaban unos niveles urinarios de S100B a las 24 horas del accidente, superiores a aquellos que sobrevivieron en el mismo periodo de tiempo.

Como ya hemos mencionado anteriormente, encontramos otros trabajos que han demostrado la utilidad y eficiencia de los niveles de S100B en orina como marcador para el diagnóstico y detección de daño cerebral en distintos tipos de patologías pediátricas, tales como hemorragias o daños cerebrales en bebés prematuros (250, 253, 254), asfixia perinatal en recién nacidos (255), o niños que presentan daño cerebral consecuencia de una situación de hipoxia o por traumatismo (182). Sin embargo, no sólo en la población pediátrica se ha estudiado el papel de la proteína S100B en orina tras el TCE grave. Schültke et al. realizaron un estudio en el que evaluaron la capacidad predictora de los niveles urinarios de S100B como indicador de la extensión del daño cerebral tras un TCE en adultos, clasificando a los pacientes en función de la gravedad del traumatismo categorizado según la GCS (183). Para ello, partió de una población de 42 pacientes agrupados en: individuos con TCE leve (GCS = 13-15), TCE moderado (GCS = 9-12) y TCE grave (GCS = ≤ 8). Los investigadores tomaron muestras de suero y orina en el momento del ingreso de los pacientes, así como a las 96 horas del accidente. Los resultados del estudio demostraron la existencia de una correlación negativa entre los niveles séricos de S100B y la puntuación alcanzada en la GCS en el momento del ingreso, en todos los grupos de pacientes traumatizados estudiados. No obstante, en referencia a los niveles de S100B en orina, sólo encontraron una correlación negativa con la puntuación de la GCS en el grupo de pacientes con TCE moderado, no así en los pacientes con TCE leve ni TCE grave. Cabe destacar que este grupo de investigadores, para realizar las determinaciones de S100B,

utilizó el reactivo de Liaison Sangtec @100 system (recordamos, no intercambiable con el método que nosotros empleamos). Además, ellos no realizaron extracciones a las 24 horas del traumatismo. A pesar de las diferencias en la metodología de los estudios, nuestros resultados coinciden con los de Schültke et al. en cuanto a que los niveles de S100B en orina, ni en el momento del ingreso, ni a las 96 horas del accidente, tienen una capacidad predictora del daño cerebral tras un TCE grave.

Tal y como se evidencia en la literatura, hasta la fecha no existe ningún estudio que haya probado que un incremento en los niveles urinarios de S100B a las 24 horas de un TCE grave, esté relacionado con un mayor riesgo de muerte a medio plazo.

Cuando hacemos referencia a los trabajos previamente publicados sobre el análisis de la concentración de la proteína S100B en orina, hemos de destacar el hecho de que la mayoría de ellos no han tenido en consideración el posible efecto dilucional de las muestras (182, 183). A pesar de las ventajas de la obtención de muestras de orina para la determinación de un analito, se sabe que su concentración en una orina elemental no tiene un gran valor, a no ser que lo referamos a la concentración de creatinina, de modo que, para valorar la concentración de un analito en orina, emplearíamos bien el cociente analito en orina-creatinina, o la concentración de dicho analito en una orina de 24 horas. La Fundación Nacional Americana del Riñón recomienda el uso del índice proteína en orina-creatinina en orina, en lugar de la recolección de una muestra de orina de 24 horas, para valorar un estado de proteinuria (244). Basándonos en estas recomendaciones, en nuestro estudio determinamos la concentración de creatinina en las muestras de orina recogidas, y evaluamos la relación existente entre el cociente proteína S100B-creatinina en orina con la evolución de los pacientes objeto de nuestro estudio. Los resultados de este análisis nos mostraron los mismos resultados que cuando evaluamos los niveles urinarios de S100B sin referir a creatinina: los pacientes que fallecieron en el plazo de un mes tras el TCE

grave, presentaron mayores niveles del índice S100B-creatinina en orina a las 24 horas del accidente, que aquellos que sobrevivieron en el mismo periodo de tiempo.

4. Proteína S100B y otras variables clínicas.

4.1. Neurocirugía

Dado que algunos pacientes fueron sometidos a una intervención neuroquirúrgica de urgencia, consideramos esta variable como una posible fuente de origen de liberación de la proteína S100B y, por lo tanto, causa de las diferencias encontradas en los niveles del biomarcador entre unos pacientes y otros, tanto en suero como en orina (251). El análisis de dichos resultados mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de S100B de pacientes sometidos a neurocirugía, y aquellos que no lo fueron. Postulamos que, probablemente, este hecho pudo ser debido a la mejora en atención prehospitalaria y en el área de emergencias de nuestro centro, dado que a pesar de la gravedad inherente del desarrollo de una neurocirugía de urgencia por el compromiso vital que supone al paciente, la rapidez y precocidad con la que fueron evacuadas estas lesiones, permitió que el daño estructural, mensurado mediante la proteína S100B, no mostrara una repercusión significativa respecto al resto de pacientes.

4.2. Politraumatismos

Dado que se postula el posible origen extracraneal de la proteína S100B, y con objeto de descartar una posible interferencia en la concentración de S100B por las lesiones extracraneales que presentaban los pacientes tras el traumatismo, agrupamos a estos en función de que hubiesen sufrido un TCE grave aislado o asociado a otras lesiones extracraneales, analizando la concentración de la S100B en un grupo y otro, siendo remarcable que no encontramos diferencias en las concentraciones de S100B

entre aquellos pacientes que sufrieron TCE y aquellos con múltiples lesiones asociadas.

A pesar de que ciertos trabajos de la bibliografía sugieren la existencia de fuentes extracraneales de S100B (256, 257), con nuestro estudio hemos probado que esas posibles fuentes no artefactan de forma relevante nuestros resultados, ya que no encontramos diferencias significativas entre los niveles de S100B de pacientes que sufrieron un TCE grave “puro” y aquellos que lo sufrieron asociado a múltiples lesiones extracraneales. Estos resultados concuerdan con otros estudios de investigación, en los cuáles no encontraron diferencias significativas en los niveles de S100B entre los pacientes con lesión cerebral traumática asociada a lesiones extracraneales y los pacientes con TCE aislado, independientemente del nivel de gravedad (227, 249, 258).

5. Aplicabilidad del estudio

A pesar de los avances en los sistemas de neuromonitorización y las nuevas técnicas de imagen, es aún difícil estimar el riesgo de deterioro de los pacientes a ME. Estos hechos conllevan que, en ocasiones, las medidas diagnóstico-terapéuticas se ponen en marcha de forma tardía cuando ya se está desarrollando un daño cerebral definido. Por este motivo, el papel de la proteína S100B como marcador pronóstico precoz, sencillo y reproducible, tan simple como una extracción sanguínea, permitirá definir de forma temprana el patrón de riesgo de cada paciente, identificando a aquéllos sujetos susceptibles de presentar una evolución desfavorable a ME.

A pesar de las mejoras en el proceso de donación y trasplante, el número de donantes de órganos se encuentra en progresivo descenso. Fundamentalmente se debe a la disminución de aquellos pacientes que tras un TCE grave evolucionan a ME

(259, 260). Este hecho lleva a los coordinadores de trasplantes al seguimiento exhaustivo de grandes cohortes de pacientes neurocríticos. Hoy en día disponemos de múltiples parámetros para el manejo de los pacientes con TCE grave: información clínica, tomográfica, parámetros de neuromonitorización multimodal invasivos (PIC, PtiO₂, PIV) y no invasivos (DTC, NIRS), guías internacionales de práctica clínica, etc (242, 261, 262). Sin embargo no disponemos de ninguna herramienta bioquímica que pueda mostrarnos aquellos pacientes con un mayor riesgo de evolución a corto plazo hacia ME durante la fase aguda del TCE. La inclusión de la proteína S100B en el manejo del paciente neurocrítico, permitiría y facilitaría el flujo de información, así como las estrategias de trasplantes, entre los hospitales donantes, los centros de trasplantes y las organizaciones de donación de órganos de varias maneras. En primer lugar, facilitaría el trabajo de los coordinadores de trasplantes, pues el protocolo identificaría a aquellos pacientes susceptibles de evolucionar a ME, minimizando los esfuerzos de los coordinadores en el seguimiento de pacientes críticos. Hemos establecido el punto de corte para la concentración sérica de S100B a las 24 horas post-trauma en 0,372 µg/L, con intención de optimizar la sensibilidad de la técnica, sin perder especificidad. Entendemos que este punto de corte generará muchos falsos positivos, pero al menos servirá para identificar a aquellos pacientes que presenten una concentración por debajo del punto de corte, como “pacientes con bajo riesgo de evolucionar a ME”. Si hubiésemos aplicado este protocolo a nuestra población de estudio, en su momento los coordinadores de trasplantes se habrían evitado el seguimiento de un 75% de los pacientes con respuesta fotomotora en al menos una pupila en el momento del ingreso, dada su baja probabilidad de evolucionar a ME. El 25% restante habría sido considerado como “pacientes con alto riesgo de evolucionar a ME”, si bien estaríamos asumiendo una alta tasa de falsos positivos. En segundo lugar, el poder focalizar esfuerzos en un menor porcentaje de pacientes, disminuiría el tiempo de diagnóstico, así como permitiría optimizar las estrategias a seguir, una vez se establece el diagnóstico de ME. Ha sido demostrado que una disminución del retraso entre el momento del diagnóstico de ME y la

solicitud del consentimiento informado a los familiares, se encuentra relacionado con una mejora de la tasa de aprobación de consentimientos (263). Por otro lado, una vez instaurada la ME acontecen importantes cambios hemodinámicos e inflamatorios que pueden ser perjudiciales en la funcionalidad de los órganos (76). Estudios en investigación básica han objetivado cambios inflamatorios y disfunción progresiva en los órganos tras la ME (264-266). A nivel clínico, mediante biopsias practicadas en riñones obtenidos de pacientes que han sufrido ME, se ha constatado que un mayor tiempo de extracción aumenta la expresión de genes relacionados con la apoptosis, así como la presencia de fenómenos inflamatorios (267, 268). Por tanto, reducir los tiempos entre la instauración de la ME y la extracción de órganos supondría una disminución de la exposición a la inflamación isquémica desencadenada tras la ME, de modo que disminuiríamos la pérdida de órganos susceptibles de donación, mejoraríamos la calidad de dichos órganos, así como se podría alcanzar una mayor tasa de supervivencia del injerto, hechos que permitirían salvar la diferencia existente entre la oferta y la demanda de órganos.

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio y una vez hemos destacado el papel de la determinación sérica de la proteína S100B como predictor de evolución a ME tras el TCE grave, proponemos un protocolo de actuación sobre dicho tipo de pacientes, que sería de gran utilidad para los coordinadores y equipos de trasplantes [figura 9]. Dado que la midriasis bilateral arreactiva por sí sola, es capaz de identificar a los pacientes que evolucionarán a ME, el punto del protocolo en el que se aplicará la determinación de la proteína S100B será una vez caracterizado el reflejo fotomotor del paciente al ingreso.

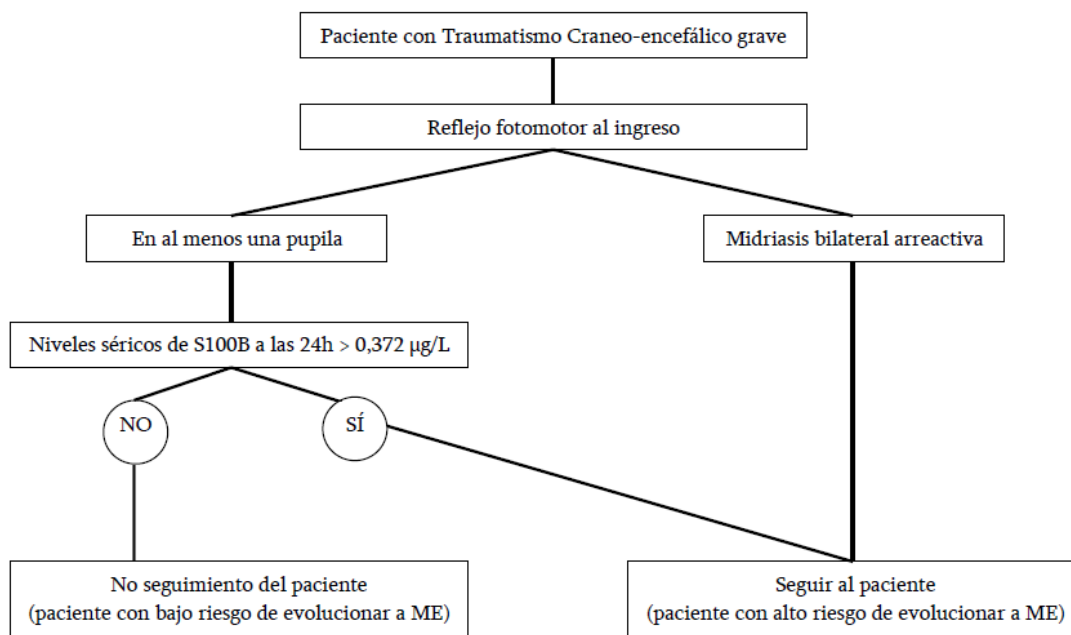


Figura 9. Algoritmo de cribado de pacientes susceptibles de seguimiento por los coordinadores de trasplantes.

Por último, queremos subrayar que los datos generados a partir de nuestros resultados y nuestro protocolo, serían meramente informativos para los clínicos y coordinadores de trasplantes, sin conllevar implicaciones terapéuticas ningunas. El empleo de la proteína S100B como biomarcador indicativo de daño cerebral, podría guiar a los clínicos en el manejo del paciente neurocrítico y en la toma de decisiones, así como proporcionaría datos objetivos para transmitir información precisa a los familiares de los pacientes. Pero en modo alguno pretendemos poner en riesgo el tratamiento o seguimiento de aquellos pacientes que presenten una concentración de S100B a las 24 horas por debajo del punto de corte. Tampoco es nuestra intención emplear los valores por encima del punto de corte como indicadores de un pronóstico prematuro, y utilizar el mismo como elemento de coacción para los familiares, instándoles a firmar el consentimiento de donación de órganos antes del diagnóstico clínico de ME.

En cuanto a los resultados obtenidos tras el estudio de la evolución de los niveles de la proteína S100B tras un TCE grave, éstos reflejan que un incremento en los niveles de dicho biomarcador, tanto en suero como en orina, a las 24 horas del traumatismo, está asociado con un peor pronóstico. La elevación de un biomarcador, bien sea en sangre o en orina, de forma precoz y previa al empeoramiento de las variables clínicas, proporcionará una información de gran valor, que puede afectar en la toma de decisiones y el manejo de los pacientes, intensificando las intervenciones terapéuticas, así como la vigilancia de los pacientes.

En referencia a la caracterización de la proteína S100B en orina, quisiéramos resaltar que, la ventaja fundamental de utilizar dicha determinación en orina, en lugar de utilizar la determinación sérica, radica en el hecho de que la orina es, habitualmente, un fluido biológico de desecho. De forma rutinaria, todos los pacientes graves que ingresan en UCI, se encuentran sometidos a sondaje vesical mediante un catéter uretral. Este hecho hace que la obtención de muestras de orina sea sencilla, práctica y menos invasiva que la extracción de sangre. Tenemos que tener en cuenta que la obtención de muestras serológicas obliga a purgar los catéteres intravasculares, lo cual ocasiona interrupciones en la medicación, en la fluidoterapia y, cómo no, pérdidas sanguíneas extraordinarias para los pacientes, los cuales al encontrarse en un estado crítico es algo a tener en consideración. Sin embargo, y a pesar de haber demostrado el papel de la proteína S100B en orina como predictor de mortalidad tras el TCE grave, la determinación de la misma proteína en suero presentó una mayor capacidad predictora de mortalidad.

A pesar de que nuestros resultados muestran que los niveles de S100B tienden a ser mayores en pacientes con TCE grave que fallecen, respecto a aquellos que sobreviven, hemos de reconocer que ni el punto de corte para los niveles de la proteína S100B en suero (0,461 µg/L), ni el punto de corte para los niveles de S100B en orina (0,025 µg/L) son los indicadores perfectos de pronóstico tras un TCE grave.

Mientras que ambos puntos de corte presentan una elevada sensibilidad para predecir la mortalidad (90%), una buena especificidad (88,4% en el caso del suero, 62,8% para la orina), así como un VPN considerablemente elevado (97,5% para suero, 96,4% para orina), ninguna de las dos determinaciones muestra un VPP muy alto, especialmente en el caso de la orina (60% para suero, 33,3% para orina). Esto quiere decir que de aquellos pacientes que presenten unos niveles de S100B en orina superiores a 0,025 µg/L (considerado como punto de corte para predecir mortalidad), tan solo un 33,3% fallecerán, mientras que el 96,4% de los pacientes que presenten unos niveles de S100B en orina por debajo de 0,025 µg/L, sobrevivirán. Hemos de tener en cuenta la dificultad de conseguir optimizar el VPP en nuestra serie, debido a la baja prevalencia de la mortalidad en la población estudiada.

A la luz de estos resultados y no menospreciando el descubrimiento de la utilidad de la concentración de la proteína S100B en orina como un indicador de lesión cerebral en pacientes con TCE grave, podemos concluir que la precisión de la concentración de la proteína S100B en suero es mayor que en orina, a la hora de predecir la mortalidad en el plazo de un mes tras un TCE grave.

6. Fortalezas del estudio

La principal fortaleza del estudio radica en el tamaño de la muestra, así como en la utilidad que supondría añadir los valores serológicos de la proteína S100B en el proceso de identificación de potenciales pacientes susceptibles de evolucionar a ME tras el TCE grave.

A su vez, nuestro estudio destaca por el momento de la valoración de la puntuación obtenida en la GCS. Con objeto de evitar que dicha puntuación se viese artefactada por la presencia de drogas u otros posibles factores de confusión

(sedoanalgesia, anemia, drogas de abuso, hipotermia, desbalance ácido-base o electrolítico...), dicha puntuación se valoró una vez se hubiesen revertido estos agentes así como se hubiese realizado una resucitación metabólica y hemodinámica.

Del mismo modo, hemos de resaltar el hecho de que las determinaciones de los niveles de S100B, así como la realización e interpretación de las pruebas de neuroimagen realizadas, fueron llevadas a cabo por los especialistas correspondientes, bioquímico y radiólogo, sin tener conocimiento alguno sobre el estado o situación del paciente, lo cual exonera a este estudio de sesgos de interés. A su vez, el diagnóstico de ME fue realizado por un neurointensivista, sin conocer los valores de S100B del paciente, ciñéndose a las indicaciones legales españolas y los requerimientos clínicos reconocidos internacionalmente (75).

7. Limitaciones del estudio

A pesar de nuestra intención de controlar todas las variables y sesgos que pudieran interferir en la calidad de los resultados, el diseño de ambos estudios presenta algunas limitaciones que consideramos adecuado comentar.

En primer lugar, el periodo de seguimiento de los pacientes fue tan solo de un mes. No hemos evaluado la precisión de la proteína S100B como predictor de mortalidad a largo plazo. No obstante, como primer punto de evaluación de los pacientes, lo podemos considerar un momento óptimo para la valoración precoz de la evolución de los pacientes supervivientes, entendiendo que para la valoración funcional de los mismos (GOS >2) si sería preciso una mayor ventana temporal entre el traumatismo y el resultado funcional, el cual se recomienda entre 12 y 18 meses (229) [Tabla 3].

En cuanto a la distribución del género en nuestra muestra, es cierto que encontramos una mayor proporción de los pacientes fueron varones. Sin embargo, este comportamiento de la muestra es consecuente con los datos demográficos existentes en la actualidad en relación a la patología traumática (5, 6), por lo que no consideramos que pueda suponer una alteración de nuestros datos. Además, diversos autores han demostrado que la concentración de S100B no varía en función del sexo (113, 269).

Como limitación de la primera parte del estudio, cabe destacar la falta de extracción de muestras más allá de las 24 horas tras el traumatismo. Si hubiésemos ampliado el periodo de extracción, podríamos haber obtenido determinaciones que habrían mostrado incrementos posteriores en los niveles de S100B, optimizando de este modo la información aportada por el biomarcador. Siendo conscientes de esta limitación, nos planteamos ampliar el periodo de seguimiento de los niveles de S100B, así como no sólo determinarlos en suero, sino también en orina. La principal limitación del segundo estudio fue la falta de análisis de la capacidad predictora de ME de las concentraciones de la proteína S100B en orina, pues dichas determinaciones fueron realizadas en 55 pacientes, de los cuáles no evolucionaron a ME un número suficiente de ellos que nos permitiera desarrollar el análisis en dicho momento.

Consideramos que, llegados a este punto, sería interesante estudiar otros biomarcadores (en conjunción con la S100B), ya que la mayoría de los estudios centrados en la predicción de ME a través de biomarcadores, se han centrado únicamente en el análisis de la proteína S100B (84, 85, 234). Además habría que evaluar el papel de la proteína S100B como predictor de ME en pacientes con TCE grave que no presentaran ninguna alteración pupilar al ingreso, aunque para ello precisamos continuar con el reclutamiento de pacientes, de forma que podamos aumentar el tamaño de la muestra, de modo que hubiese un número considerable de pacientes con dichas características.

VI. CONCLUSIONES

1. La determinación de S100B en suero a las 24 horas tras el TCE grave, proporciona una información precoz y sensible para la estratificación del riesgo que presentan los pacientes de evolucionar a muerte encefálica.

2. La utilidad de la proteína S100B en suero como herramienta predictora de muerte encefálica es más eficiente si se realiza únicamente en pacientes que presentan alguna respuesta fotomotora al ingreso hospitalario.

3. La determinación de los niveles de la proteína S100B, tanto en suero como en orina, a las 24 horas de un TCE grave, actúa como un factor predictor de mortalidad precoz al mes del traumatismo.

4. La determinación de S100B en suero muestra una mayor capacidad pronóstica de mortalidad al mes de traumatismo que la determinación en orina.

BIBLIOGRAFÍA

1. The World bank (1998). World development indicators 1998. Washington DC, The World Bank, 1998.
2. Peden M, McGee K, Sharma G. The injury chart book: a graphical overview of the global burden of injuries. Geneva, World Health Organization, 2002.
3. Baker CC, Oppenheimer L, Stephens B, Lewis FR, Trunkey DD. Epidemiology of trauma deaths. *Am J Surg.* 1980 Jul;140(1):144-50.
4. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am.* 1983 Aug;249(2):28-35.
5. Vazquez-Barquero A, Vazquez-Barquero JL, Trigueros F, Paternina B, Herrera S, Gaité L, et al. [Morbidity and mortality in craniocerebral trauma: epidemiologic study in Cantabria]. *Neurologia.* 1990 Oct;5(8):265-70.
6. Klauber MR, Barrett-Connor E, Marshall LF, Bowers SA. The epidemiology of head injury: a prospective study of an entire community-San Diego County, California, 1978. *Am J Epidemiol.* 1981 May;113(5):500-9.
7. Plurad D, Demetriades D, Gruzinski G, Preston C, Chan L, Gaspard D, et al. Motor vehicle crashes: the association of alcohol consumption with the type and severity of injuries and outcomes. *J Emerg Med.* 2010 Jan;38(1):12-7.
8. Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation.* 2007;22(5):341-53.
9. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2006 Mar;148(3):255-68; discussion 68.
10. Finfer SR, Cohen J. Severe traumatic brain injury. *Resuscitation.* 2001 Jan;48(1):77-90.
11. Catherine Pérez y Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología. Medida del impacto en salud de las lesiones por tráfico en España. Jornadas sobre Prevención de lesiones y promoción de la seguridad. Ministerio de Sanidad y Consumo. Mayo 2009.
12. Murillo, F., Gilli, M., Muñoz, M.A. Epidemiología del traumatismo craneoencefálico. En Net A, Marruecos-Sant , Traumatismo craneoencefálico grave. Springer Verlag Ibérica. Barcelona. 1996;1-9.
13. Silver I, Erecinska M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol.* 1998;454:7-16.

14. Díez-Tejedor, E. Y Frank, A. Fisiología de circulación cerebral y bases de su fisiopatología. En: J.L. Martí-Vilalta (ed.), *Enfermedades Vasculares Cerebrales*. Editorial MCR, Madrid, 1993;55-76.
15. Sahuquillo J, Poca MA y Rubio E. Monitorización de la presión intracraneal. Metodología en el paciente con patología neurológica aguda. En: A. Net y L Marruecos (Eds). *Neurología Crítica*. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona. 2008; 57-78.
16. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Feb;24(2):133-50.
17. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol*. 2004 Jan;115(1):4-18.
18. Stelmasiak Z, Dudkowska-Konopa A, Rejdak K. Head trauma and neuroprotection. *Med Sci Monit*. 2000 Mar-Apr;6(2):426-32.
19. Murillo-Cabezas F. M-SM. Traumatismo craneoencefálico. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Samiuc. 1999.
20. Yus-Teruel S. C-GM. Traumatismo Craneoencefálico (TCE). Manual de Medicina Intensiva. 2ª edición. (Montejo J.C., García de Lorenzo A., Ortiz Leyba C., Bonet A.) Ed Harcourt 2ª edición. 2000
21. Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma*. 2005 Jan;22(1):42-75.
22. Revuelto-Rey J, Egea-Guerrero JJ, Muñoz-Sánchez MA, Murillo-Cabezas F. [Cerebral microdialysis in the current clinical setting]. *Med Intensiva*. 2012 Apr;36(3):213-9.
23. 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.
24. 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.
25. Biegon A, Fry PA, Paden CM, Alexandrovich A, Tsenter J, Shohami E. Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):5117-22.
26. Sullivan PG, Keller JN, Mattson MP, Scheff SW. Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: implications for impaired mitochondrial and transport function. *J Neurotrauma*. 1998 Oct;15(10):789-98.
27. Bhalla US, Iyengar R. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science*. 1999 Jan 15;283(5400):381-7.

28. Weng G, Bhalla US, Iyengar R. Complexity in biological signaling systems. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):92-6.
29. Talamonti G, Fontana RA, Bizzozero L, Versari P, Collice M. Head-injured patients who talk and deteriorate. *J Neurosurg*. 1992 Jul;77(1):161-2.
30. Murillo F MM, Dominguez JM. . Fisiopatología de la lesión secundaria en el traumatismo craneoencefálico. . In: *Net A M-SLTcgBS-VI*, editor1996.
31. Egea-Guerrero JJ R-RJ-. Monitorización multimodal del paciente neurocrítico.: Soporte vital y monitorización del paciente crítico. Edición 2012. ISBN: 978-84-939602-.
32. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma*. 1993 Feb;34(2):216-22.
33. Bayir H, Clark RS, Kochanek PM. Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma. *Crit Care Med*. 2003 Jan;31(1 Suppl):S112-7.
34. Fu ES, Tummala RP. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2005 Apr;18(2):181-7.
35. Previgliano I NJ, D´Errico M. . Guías para la evaluación, tratamiento y pronóstico del Traumatismo de Cráneo Grave Cerrado. 2007.
36. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Feb;23(2):137-49.
37. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):687-98.
38. The Brain Trauma Foundation, The American Association of Neurological Surgeons, The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury. 3rd edition. *J Neurotrauma* 2007;24:S1-S106.
39. Rosner MJ. Pathophysiology and management of increased intracranial pressure. In: Andrews BT (ed.) *Neurosurgical Intensive Care*. McGraw-Hill, Inc. Nueva York, 1993; 57-112.
40. Murillo-Cabezas F., Muñoz-Sánchez MA. Traumatismo Craneoencefálico Grave. In: *Terapia Intensiva*. 3 rd Edition. Pacín J (Ed). Argentina, Editorial Médica Panamericana, 2000; 224-244.
41. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3;348(14):1365-75.
42. LaPlaca MC, Simon CM, Prado GR, Cullen DK. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res*. 2007;161:13-26.

43. Delbarre G, Delbarre B, Calinon F, Ferger A. Accumulation of amino acids and hydroxyl free radicals in brain and retina of gerbil after transient ischemia. *J Ocul Pharmacol.* 1991 Summer;7(2):147-55.
44. Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, Scheff SW, Lovell MA. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radic Biol Med.* 2006 Jul 1;41(1):77-85.
45. Ozdemir D, Uysal N, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Topcu A, et al. Effect of melatonin on brain oxidative damage induced by traumatic brain injury in immature rats. *Physiol Res.* 2005;54(6):631-7.
46. Solaroglu I, Okutan O, Kaptanoglu E, Beskonakli E, Kilinc K. Increased xanthine oxidase activity after traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2005 Apr;12(3):273-5.
47. Ansari MA, Ahmad AS, Ahmad M, Salim S, Yousuf S, Ishrat T, et al. Selenium protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. *Biol Trace Elem Res.* 2004 Oct;101(1):73-86.
48. Ansari MA, Joshi G, Huang Q, Opii WO, Abdul HM, Sultana R, et al. In vivo administration of D609 leads to protection of subsequently isolated gerbil brain mitochondria subjected to in vitro oxidative stress induced by amyloid beta-peptide and other oxidative stressors: relevance to Alzheimer's disease and other oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Free Radic Biol Med.* 2006 Dec 1;41(11):1694-703.
49. Singh IN, Sullivan PG, Hall ED. Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers. *J Neurosci Res.* 2007 Aug 1;85(10):2216-23.
50. Bayir H KV, Clark RS, Janesko-Feldman K, Rafikov R, Huang Z, Zhang X, Vagni V, Billiar TR, Kochanek PM. Neuronal NOS-mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury. *J Neurochem* 2007;101:168-81.
51. Hall ED DM, Johnson K, Kupina NC. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004;21:9-20.
52. DeKosky ST, Taffe KM, Abrahamson EE, Dixon CE, Kochanek PM, Ikonomic MD. Time course analysis of hippocampal nerve growth factor and antioxidant enzyme activity following lateral controlled cortical impact brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2004 May;21(5):491-500.
53. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 2005 Jan 1-15;79(1-2):157-65.
54. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol.* 2000 Apr;60(5):409-70.

55. Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, et al. Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 Aug;81(4):805-13.
56. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982 Nov;47(5):412-26.
57. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984 Apr 1;219(1):1-14.
58. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 1998 Oct;56(3):359-84.
59. Choe H, Hansen JM, Harris C. Spatial and temporal ontogenies of glutathione peroxidase and glutathione disulfide reductase during development of the prenatal rat. *J Biochem Mol Toxicol.* 2001;15(4):197-206.
60. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999 Nov;27(9-10):916-21.
61. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med.* 2008 Aug 15;45(4):443-52.
62. 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.
63. Maas AI, Hukkelhoven CW, Marshall LF, Steyerberg EW. Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors. *Neurosurgery.* 2005 Dec;57(6):1173-82; discussion -82.
64. Servadei F, Murray GD, Penny K, Teasdale GM, Dearden M, Iannotti F, et al. The value of the "worst" computed tomographic scan in clinical studies of moderate and severe head injury. *European Brain Injury Consortium. Neurosurgery.* 2000 Jan;46(1):70-5; discussion 5-7.
65. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.* 1974 Jul 13;2(7872):81-4.
66. Civil ID, Schwab CW. The Abbreviated Injury Scale, 1985 revision: a condensed chart for clinical use. *J Trauma.* 1988 Jan;28(1):87-90.
67. Copes WS SW, Champion HR, Bain LW. "Progress in Characterising Anatomic Injury", In *Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Association for the Advancement of Automotive Medicine*, Baltimore, MA, USA (205-218).

68. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma*. 1974 Mar;14(3):187-96.
69. Brennenman FD, Boulanger BR, McLellan BA, Redelmeier DA. Measuring injury severity: time for a change? *J Trauma*. 1998 Apr;44(4):580-2.
70. Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet*. 1975 Mar 1;1(7905):480-4.
71. Wijdicks EF. Determining brain death in adults. *Neurology*. 1995 May;45(5):1003-11.
72. Ashwal S, Schneider S. Brain death in children: Part II. *Pediatr Neurol*. 1987 Mar-Apr;3(2):69-77.
73. Mollaret P, Goulon M. [The depassed coma (preliminary memoir)]. *Rev Neurol (Paris)*. 1959 Jul;101:3-15.
74. A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. *JAMA*. 1968 Aug 5;205(6):337-40.
75. Wijdicks EF. The diagnosis of brain death. *N Engl J Med*. 2001 Apr 19;344(16):1215-21.
76. Dominguez-Roldan JM, Garcia-Alfaro C, Jimenez-Gonzalez PI, Hernandez-Hazanas F, Gascon Castillo ML, Egea Guerrero JJ. [Brain death: repercussion on the organs and tissues]. *Med Intensiva*. 2009 Dec;33(9):434-41.
77. Murugan R, Venkataraman R, Wahed AS, Elder M, Hergenroeder G, Carter M, et al. Increased plasma interleukin-6 in donors is associated with lower recipient hospital-free survival after cadaveric organ transplantation. *Crit Care Med*. 2008 Jun;36(6):1810-6.
78. Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, Koefoed-Nielsen J, Bach A, Nyboe R, et al. Does brain death induce a pro-inflammatory response at the organ level in a porcine model? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 May;52(5):621-7.
79. Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, Salas E, Riancho JA, Lopez-Cordovilla JJ, et al. Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. *Metabolism*. 1995 Jun;44(6):812-6.
80. Dominguez-Roldan JM, Barrera-Chacon JM, Martin-Bermudez R, Murillo-Cabezas F, Garcia-Alfaro C, Rincon-Ferrari MD. Changes in the intracranial pulse pressure waveform associated with brain death. *Transplant Proc*. 1999 Sep;31(6):2597-8.
81. Figaji AA, Kent SJ. Brain tissue oxygenation in children diagnosed with brain death. *Neurocrit Care*. 2010 Feb;12(1):56-61.
82. Egea-Guerrero JJ, Gordillo-Escobar E, Revuelto-Rey J, Enamorado-Enamorado J, Vilches-Arenas A, Pacheco-Sanchez M, et al. Clinical variables and neuromonitoring

information (intracranial pressure and brain tissue oxygenation) as predictors of brain-death development after severe traumatic brain injury. *Transplant Proc.* 2012 Sep;44(7):2050-2.

83. Raabe A, Seifert V. Protein S-100B as a serum marker of brain damage in severe head injury: preliminary results. *Neurosurg Rev.* 2000 Sep;23(3):136-8.

84. Regner A, Kaufman M, Friedman G, Chemale I. Increased serum S100beta protein concentrations following severe head injury in humans: a biochemical marker of brain death? *Neuroreport.* 2001 Mar 26;12(4):691-4.

85. Dimopoulou I, Korfiatis S, Dafni U, Anthi A, Psachoulia C, Jullien G, et al. Protein S-100b serum levels in trauma-induced brain death. *Neurology.* 2003 Mar 25;60(6):947-51.

86. Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2001 May;18(5):491-8.

87. Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Wiedemann E, Gippner-Steppert C, Mutschler W, et al. Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2002 Dec;30(12):2669-74.

88. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, et al. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology.* 2010 Nov 16;75(20):1786-93.

89. Tumani H, Teunissen C, Sussmuth S, Otto M, Ludolph AC, Brettschneider J. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration in chronic neurological diseases. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008 Jul;8(4):479-94.

90. Leon-Carrion J, Dominguez-Morales Mdel R, Barroso y Martin JM, Murillo-Cabezas F. Epidemiology of traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage. *Pituitary.* 2005;8(3-4):197-202.

91. Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma.* 2010 Jul;69(1):104-9.

92. Pelinka LE, Kroepfl A, Schmidhammer R, Krenn M, Buchinger W, Redl H, et al. Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma. *J Trauma.* 2004 Nov;57(5):1006-12.

93. Kochanek PM, Berger RP, Bayir H, Wagner AK, Jenkins LW, Clark RS. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Curr Opin Crit Care.* 2008 Apr;14(2):135-41.

94. Petzold A, Green AJ, Keir G, Fairley S, Kitchen N, Smith M, et al. Role of serum S100B as an early predictor of high intracranial pressure and mortality in brain injury: a pilot study. *Crit Care Med.* 2002 Dec;30(12):2705-10.
95. Romeo MJ, Espina V, Lowenthal M, Espina BH, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA. CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev Proteomics.* 2005 Jan;2(1):57-70.
96. Gao J, Garulacan LA, Storm SM, Opiteck GJ, Dubaquié Y, Hefta SA, et al. Biomarker discovery in biological fluids. *Methods.* 2005 Mar;35(3):291-302.
97. Kleindienst A, Hesse F, Bullock MR, Buchfelder M. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog Brain Res.* 2007;161:317-25.
98. Uden J, Astrand R, Waterloo K, Ingebrigtsen T, Bellner J, Reinstrup P, et al. Clinical significance of serum S100B levels in neurointensive care. *Neurocrit Care.* 2007;6(2):94-9.
99. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011 Mar;93(3):421-43.
100. Pelinka LE, Kroepfl A, Leixnering M, Buchinger W, Raabe A, Redl H. GFAP versus S100B in serum after traumatic brain injury: relationship to brain damage and outcome. *J Neurotrauma.* 2004 Nov;21(11):1553-61.
101. Seco M, Edelman JJ, Wilson MK, Bannon PG, Vallely MP. Serum biomarkers of neurologic injury in cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 2012 Sep;94(3):1026-33.
102. Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, van Haaren M, Beems T, Zimmerman C, et al. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology.* 2004 Apr 27;62(8):1303-10.
103. Herrmann M, Ebert AD, Galazky I, Wunderlich MT, Kunz WS, Huth C. Neurobehavioral outcome prediction after cardiac surgery: role of neurobiochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue. *Stroke.* 2000 Mar;31(3):645-50.
104. Marangos PJ, Campbell IC, Schmechel DE, Murphy DL, Goodwin FK. Blood platelets contain a neuron-specific enolase subunit. *J Neurochem.* 1980 May;34(5):1254-8.
105. Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Heckl U, Gruber R, Linsenmaier U, et al. Immediate S-100B and neuron-specific enolase plasma measurements for rapid evaluation of primary brain damage in alcohol-intoxicated, minor head-injured patients. *Shock.* 2002 Nov;18(5):395-400.
106. Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta.* 1989 Jul 31;183(1):13-31.
107. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jul 4;48(1):1-11.

108. Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, Davidsson P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, et al. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett*. 2001 Jan 19;297(3):187-90.
109. Gabbita SP, Scheff SW, Menard RM, Roberts K, Fugaccia I, Zemlan FP. Cleaved-tau: a biomarker of neuronal damage after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005 Jan;22(1):83-94.
110. Zemlan FP, Jauch EC, Mulchahey JJ, Gabbita SP, Rosenberg WS, Speciale SG, et al. C-tau biomarker of neuronal damage in severe brain injured patients: association with elevated intracranial pressure and clinical outcome. *Brain Res*. 2002 Aug 23;947(1):131-9.
111. Bazarian JJ, Zemlan FP, Mookerjee S, Stigbrand T. Serum S-100B and cleaved-tau are poor predictors of long-term outcome after mild traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2006 Jun;20(7):759-65.
112. Schwartz JG, Bazan C, 3rd, Gage CL, Prihoda TJ, Gillham SL. Serum creatine kinase isoenzyme BB is a poor index to the size of various brain lesions. *Clin Chem*. 1989 Apr;35(4):651-4.
113. Berger RP, Adelson PD, Pierce MC, Dulani T, Cassidy LD, Kochanek PM. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J Neurosurg*. 2005 Jul;103(1 Suppl):61-8.
114. Cata JP, Abdelmalak B, Farag E. Neurological biomarkers in the perioperative period. *Br J Anaesth*. 2011 Dec;107(6):844-58.
115. Liu MC, Akinyi L, Scharf D, Mo J, Larner SF, Muller U, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 as a biomarker for ischemic and traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurosci*. 2010 Feb;31(4):722-32.
116. Gong B, Leznik E. The role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegenerative disorders. *Drug News Perspect*. 2007 Jul-Aug;20(6):365-70.
117. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 1998 Oct 1;395(6701):451-2.
118. Lewis SB, Wolper R, Chi YY, Miralia L, Wang Y, Yang C, et al. Identification and preliminary characterization of ubiquitin C terminal hydrolase 1 (UCHL1) as a biomarker of neuronal loss in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Res*. 2010 May 15;88(7):1475-84.
119. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965 Jun 9;19(6):739-44.
120. Marenholz I, Lovering RC, Heizmann CW. An update of the S100 nomenclature. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1763(11):1282-3.
121. Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 2008;12(4):198-204.

122. Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, et al. S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010.
123. Bhattacharya S, Bunick CG, Chazin WJ. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Dec 6;1742(1-3):69-79.
124. Yu WH, Fraser PE. S100beta interaction with tau is promoted by zinc and inhibited by hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001 Apr 1;21(7):2240-6.
125. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1793(6):1008-22.
126. Michetti F, Massaro A, Murazio M. The nervous system-specific S-100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett.* 1979 Feb;11(2):171-5.
127. Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res.* 2007 May 15;85(7):1373-80.
128. Isobe T, Ishioka N, Masuda T, Takahashi Y, Ganno S, Okuyama T. A rapid separation of S100 subunits by high performance liquid chromatography: the subunit compositions of S100 proteins. *Biochem Int.* 1983 Mar;6(3):419-26.
129. Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996 Apr;21(4):134-40.
130. Jonsson H, Johnsson P, Hoglund P, Alling C, Blomquist S. Elimination of S100B and renal function after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2000 Dec;14(6):698-701.
131. Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta.* 2004 Apr;342(1-2):1-12.
132. Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein HG. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Mar;49(3):409-24.
133. Ruetzler K, Buhner C, Grimmer I, Muller C, Nagdyman N, Obladen M. Urinary S-100B concentrations in term and preterm infants at risk for brain damage. *Biol Neonate.* 2006;89(4):260-4.
134. Donato R, Heizmann CW. S100B Protein in the Nervous System and Cardiovascular Apparatus in Normal and Pathological Conditions. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:929712.
135. Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB. Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium.* 1996 Sep;20(3):279-85.
136. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep.* 2007 May;8(5):504-9.

137. Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*. 2007 Jan 15;55(2):165-77.
138. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, et al. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*. 2007 Aug 22;26(16):3868-78.
139. Ma W, Lee SE, Guo J, Qu W, Hudson BI, Schmidt AM, et al. RAGE ligand upregulation of VEGF secretion in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Mar;48(3):1355-61.
140. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2007 Dec;7(8):711-24.
141. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999 Jun 25;97(7):889-901.
142. Esposito G, De Filippis D, Cirillo C, Sarnelli G, Cuomo R, Iuvone T. The astroglial-derived S100beta protein stimulates the expression of nitric oxide synthase in rodent macrophages through p38 MAP kinase activation. *Life Sci*. 2006 May 1;78(23):2707-15.
143. Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, et al. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol*. 2001 Sep;171(1):29-45.
144. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*. 2007 Jul 29;147(4):867-83.
145. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1387-94.
146. Omori K, Ohira T, Uchida Y, Ayilavarapu S, Batista EL, Jr., Yagi M, et al. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *J Leukoc Biol*. 2008 Jul;84(1):292-301.
147. Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res*. 2000 Jan 17;853(1):74-80.
148. Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia*. 2001 Feb;33(2):131-42.
149. Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Kriegstein J. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*. 2000 Mar 6;858(1):121-8.

150. Kogel D, Peters M, König HG, Hashemi SM, Bui NT, Arolt V, et al. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*. 2004;127(4):913-20.
151. Pichiule P, Chavez JC, Schmidt AM, Vannucci SJ. Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *J Biol Chem*. 2007 Dec 14;282(50):36330-40.
152. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol*. 1989 Dec;109(6 Pt 1):3063-71.
153. Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res*. 1997 Apr 11;753(2):196-201.
154. Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO, Jr. Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res*. 1991 Mar 1;542(2):280-5.
155. Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N. S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol*. 1992 Jun;23(4):451-66.
156. Nishi M, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT 1A agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. *Synapse*. 1996 May;23(1):1-9.
157. Ueda S, Kokotos Leonardi ET, Bell J, 3rd, Azmitia EC. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995 Apr;29(2):365-8.
158. Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):3554-8.
159. Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005 Jun;22(6):645-55.
160. Kleindienst A, Ross Bullock M. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma*. 2006 Aug;23(8):1185-200.
161. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, et al. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 2006 Feb;26(1):81-6.

162. Reali C, Scintu F, Pillai R, Donato R, Michetti F, Sogos V. S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *J Neurosci Res.* 2005 Sep 1;81(5):677-86.
163. Businaro R, Leone S, Fabrizi C, Sorci G, Donato R, Lauro GM, et al. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res.* 2006 Apr;83(5):897-906.
164. Schmitt KR, Kern C, Lange PE, Berger F, Abdul-Khaliq H, Hendrix S. S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. *Neurosci Res.* 2007 Sep;59(1):68-73.
165. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):97-108.
166. Fano G, Mariggio MA, Angelella P, Nicoletti I, Antonica A, Fulle S, et al. The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells. *Neuroscience.* 1993 Apr;53(4):919-25.
167. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem.* 1997 Dec;69(6):2294-301.
168. Kapural M, Krizanac-Bengez L, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D, et al. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res.* 2002 Jun 14;940(1-2):102-4.
169. Dyck RH, Van Eldik LJ, Cynader MS. Immunohistochemical localization of the S-100 beta protein in postnatal cat visual cortex: spatial and temporal patterns of expression in cortical and subcortical glia. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993 Apr 16;72(2):181-92.
170. Stalnacke BM, Tegner Y, Sojka P. Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study. *Clin J Sport Med.* 2003 Sep;13(5):292-302.
171. Jensen R, Marshak DR, Anderson C, Lukas TJ, Watterson DM. Characterization of human brain S100 protein fraction: amino acid sequence of S100 beta. *J Neurochem.* 1985 Sep;45(3):700-5.
172. Hidaka H, Endo T, Kawamoto S, Yamada E, Umekawa H, Tanabe K, et al. Purification and characterization of adipose tissue S-100b protein. *J Biol Chem.* 1983 Feb 25;258(4):2705-9.
173. Korfiatis S, Stranjalis G, Papadimitriou A, Psachoulia C, Daskalakis G, Antsaklis A, et al. Serum S-100B protein as a biochemical marker of brain injury: a review of current concepts. *Curr Med Chem.* 2006;13(30):3719-31.
174. Pelinka LE, Szalay L, Jafarmadar M, Schmidhammer R, Redl H, Bahrami S. Circulating S100B is increased after bilateral femur fracture without brain injury in the rat. *Br J Anaesth.* 2003 Oct;91(4):595-7.

175. Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Dijlai-Merzoug R, Settergren G. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery*. 2001 Jun;48(6):1255-8; discussion 8-60.
176. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschetti M, Kornacka M, Lituania M, et al. Measurement of urinary S100B protein concentrations for the early identification of brain damage in asphyxiated full-term infants. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003 Dec;157(12):1163-8.
177. Gazzolo D, Bruschetti M, Lituania M, Serra G, Bonacci W, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem*. 2001 Oct;47(10):1836-8.
178. Florio P, Marinoni E, Di Iorio R, Bashir M, Ciotti S, Sacchi R, et al. Urinary S100B protein concentrations are increased in intrauterine growth-retarded newborns. *Pediatrics*. 2006 Sep;118(3):e747-54.
179. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschetti M, Kornacka M, Lituania M, et al. Urinary S100B protein measurements: A tool for the early identification of hypoxic-ischemic encephalopathy in asphyxiated full-term infants. *Crit Care Med*. 2004 Jan;32(1):131-6.
180. Gazzolo D, Frigiola A, Bashir M, Iskander I, Mufeed H, Aboulgar H, et al. Diagnostic accuracy of S100B urinary testing at birth in full-term asphyxiated newborns to predict neonatal death. *PLoS One*. 2009;4(2):e4298.
181. Gazzolo D, Florio P, Ciotti S, Marinoni E, di Iorio R, Bruschetti M, et al. S100B protein in urine of preterm newborns with ominous outcome. *Pediatr Res*. 2005 Dec;58(6):1170-4.
182. Berger RP, Kochanek PM. Urinary S100B concentrations are increased after brain injury in children: A preliminary study. *Pediatr Crit Care Med*. 2006 Nov;7(6):557-61.
183. Schultke E, Sadanand V, Kelly ME, Griebel RW, Juurlink BH. Can admission S-100beta predict the extent of brain damage in head trauma patients? *Can J Neurol Sci*. 2009 Sep;36(5):612-6.
184. Michetti F, Massaro A, Russo G, Rigon G. The S-100 antigen in cerebrospinal fluid as a possible index of cell injury in the nervous system. *J Neurol Sci*. 1980 Jan;44(2-3):259-63.
185. Beaudeau J, Dequen L, Foglietti M. [Pathophysiologic aspects of S-100beta protein: a new biological marker of brain pathology]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1999 May;57(3):261-72.
186. Berger RP, Pierce MC, Wisniewski SR, Adelson PD, Clark RS, Ruppel RA, et al. Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics*. 2002 Feb;109(2):E31.
187. Bohmer AE, Oses JP, Schmidt AP, Peron CS, Krebs CL, Oppitz PP, et al. Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in

patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2011 Jun;68(6):1624-30; discussion 30-1.

188. Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg*. 1989 Nov;71(5 Pt 1):727-31.

189. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 2001 Aug 20;310(2):173-86.

190. Anneren G, Esscher T, Larsson L, Olsen L, Pahlman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in amniotic fluid as markers of abdominal wall and neural tube defects in the fetus. *Prenat Diagn*. 1988 Jun;8(5):323-8.

191. Sindic CJ, Freund M, Van Regemorter N, Verellen-Dumoulin C, Masson PL. S-100 protein in amniotic fluid of anencephalic fetuses. *Prenat Diagn*. 1984 Jul-Aug;4(4):297-302.

192. Portela LC, Tort AB, Neto EC, Kessler RG, Penchaszadeh V, Souza DO, et al. High immunocontent of S100 beta protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000 Nov;16(6):590-2.

193. Tort AB, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Goncalves CA, Netto C, Giugliani R, et al. Specificity and sensitivity of S100B levels in amniotic fluid for Down syndrome diagnosis. *Life Sci*. 2004 Dec 10;76(4):379-84.

194. Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Souza DO, et al. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem*. 2004 Feb;37(2):134-7.

195. Gerlach R, Demel G, Konig HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):1697-701.

196. Murabayashi M, Minato M, Okuhata Y, Makimoto M, Hosono S, Masaoka N, et al. Kinetics of serum S100B in newborns with intracranial lesions. *Pediatr Int*. 2008 Feb;50(1):17-22.

197. Stuart A, Edvinsson L, Kallen K, Olofsson P, Hellsten C, Amer-Wahlin I. Fetal electrocardiographic monitoring during labor in relation to cord blood levels of the brain-injury marker protein S-100. *J Perinat Med*. 2008;36(2):136-41.

198. Oertel M, Schumacher U, McArthur DL, Kastner S, Boker DK. S-100B and NSE: markers of initial impact of subarachnoid haemorrhage and their relation to vasospasm and outcome. *J Clin Neurosci*. 2006 Oct;13(8):834-40.

199. Li Y, Wang J, Sheng JG, Liu L, Barger SW, Jones RA, et al. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem*. 1998 Oct;71(4):1421-8.

200. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res.* 1994 Nov 1;39(4):398-404.
201. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Sep 29;1223(3):398-403.
202. Foerch C, Wunderlich MT, Dvorak F, Humpich M, Kahles T, Goertler M, et al. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke.* 2007 Sep;38(9):2491-5.
203. Sussmuth SD, Tumani H, Ecker D, Ludolph AC. Amyotrophic lateral sclerosis: disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum. *Neurosci Lett.* 2003 Dec 15;353(1):57-60.
204. Hoyaux D, Decaestecker C, Heizmann CW, Vogl T, Schafer BW, Salmon I, et al. S100 proteins in Corpora amylacea from normal human brain. *Brain Res.* 2000 Jun 9;867(1-2):280-8.
205. Koch M, Mostert J, Heersema D, Teelken A, De Keyser J. Plasma S100beta and NSE levels and progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2007 Jan 31;252(2):154-8.
206. Rejdak K, Petzold A, Stelmasiak Z, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid brain specific proteins in relation to nitric oxide metabolites during relapse of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 Jan;14(1):59-66.
207. Schenatto CB, Xavier RM, Bredemeier M, Portela LV, Tort AB, Dedavid e Silva TL, et al. Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis.* 2006 Jun;65(6):829-31.
208. Braga CW, Martinez D, Wofchuk S, Portela LV, Souza DO. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med.* 2006 Aug;7(5):431-5.
209. Yang XY, Lin J, Lu XY, Zhao XY. Expression of S100B protein levels in serum and cerebrospinal fluid with different forms of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008 Mar;27(3):353-7.
210. Leite MC, Brolese G, de Almeida LM, Pinero CC, Gottfried C, Goncalves CA. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull.* 2006 Jun 30;70(2):179-85.
211. Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, Missler U, Peters M, Rudolf S, et al. S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord.* 2001 Sep;66(1):89-93.
212. Andreatza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2007 Sep;41(6):523-9.

213. Hsieh HL, Schafer BW, Sasaki N, Heizmann CW. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jul 25;307(2):375-81.
214. Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 29;102(13):4735-40.
215. Markowitz J, Mackerell AD, Jr., Carrier F, Charpentier TH, Weber DJ. Design of Inhibitors for S100B. *Curr Top Med Chem.* 2005;5(12):1093-108.
216. von Schoultz E, Hansson LO, Djureen E, Hansson J, Karnell R, Nilsson B, et al. Prognostic value of serum analyses of S-100 beta protein in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1996 Apr;6(2):133-7.
217. Faries MB, Gupta RK, Ye X, Lee C, Yee R, Leopoldo Z, et al. A Comparison of 3 tumor markers (MIA, TA90IC, S100B) in stage III melanoma patients. *Cancer Invest.* 2007 Aug;25(5):285-93.
218. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008 May;35(5):433-44.
219. Marchi N, Mazzone P, Fazio V, Mekhail T, Masaryk T, Janigro D. ProApolipoprotein A1: a serum marker of brain metastases in lung cancer patients. *Cancer.* 2008 Mar 15;112(6):1313-24.
220. Jonsson H. S100B and cardiac surgery: possibilities and limitations. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):151-7.
221. Parker TG, Marks A, Tsoporis JN. Induction of S100b in myocardium: an intrinsic inhibitor of cardiac hypertrophy. *Can J Appl Physiol.* 1998 Aug;23(4):377-89.
222. Tsoporis JN, Marks A, Van Eldik LJ, O'Hanlon D, Parker TG. Regulation of the S100B gene by alpha 1-adrenergic stimulation in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jan;284(1):H193-203.
223. Tsoporis JN, Marks A, Haddad A, Dawood F, Liu PP, Parker TG. S100B expression modulates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2005 Feb 8;111(5):598-606.
224. Tsoporis JN, Izhar S, Leong-Poi H, Desjardins JF, Huttunen HJ, Parker TG. S100B interaction with the receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel receptor-mediated mechanism for myocyte apoptosis postinfarction. *Circ Res.* 2010 Jan 8;106(1):93-101.
225. Riuzzi F, Sorci G, Donato R. S100B stimulates myoblast proliferation and inhibits myoblast differentiation by independently stimulating ERK1/2 and inhibiting p38 MAPK. *J Cell Physiol.* 2006 May;207(2):461-70.

226. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209-38.
227. Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, Murillo-Cabezas F, Muñoz-Sánchez MA, Vilches-Arenas A, Sánchez-Linares P, et al. Accuracy of the S100beta protein as a marker of brain damage in traumatic brain injury. *Brain Inj.* 2012;26(1):76-82.
228. Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer KJ, Kroetz M, Mussack T, Kanz KG, et al. Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock.* 2006 May;25(5):446-53.
229. Murillo-Cabezas F, Muñoz-Sánchez MA, Rincon-Ferrari MD, Martín-Rodríguez JF, Amaya-Villar R, García-Gómez S, et al. The prognostic value of the temporal course of S100beta protein in post-acute severe brain injury: A prospective and observational study. *Brain Inj.* 2010;24(4):609-19.
230. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care.* 2007;6(2):121-38.
231. Servadei F, Teasdale G, Merry G. Defining acute mild head injury in adults: a proposal based on prognostic factors, diagnosis, and management. *J Neurotrauma.* 2001 Jul;18(7):657-64.
232. Müller K, Townend W, Biasca N, Uden J, Waterloo K, Romner B, et al. S100B serum level predicts computed tomography findings after minor head injury. *J Trauma.* 2007 Jun;62(6):1452-6.
233. Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Early S-100B serum level correlates to quality of life in patients after severe head injury. *Brain Inj.* 2002 Sep;16(9):807-16.
234. Raabe A, Seifert V. Fatal secondary increase in serum S-100B protein after severe head injury. Report of three cases. *J Neurosurg.* 1999 Nov;91(5):875-7.
235. Raabe A, Grolms C, Sorge O, Zimmermann M, Seifert V. Serum S-100B protein in severe head injury. *Neurosurgery.* 1999 Sep;45(3):477-83.
236. Escudero D. [Brain death diagnosis]. *Med Intensiva.* 2009 May;33(4):185-95.
237. Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, Gordillo-Escobar E. [Cerebral death is not a synonym of whole brain death]. *Neurología.* 2012 Jul-Aug;27(6):377-8.
238. Domínguez-Roldán JM M-CF, Muñoz-Sánchez MA, Santamaría JL, Maestre A, Rivera V. . Sonografía Doppler Transcraneal. Un método útil para el diagnóstico de la parada circulatoria cerebral que acompaña a la muerte cerebral. *Revista Española de Trasplantes.* 1994; 3:30-5.
239. Domínguez-Roldán JM E-GJ, García-Alfaro C, Jiménez-González P, Hernández Hazañas F, Murillo-Cabezas F. Transcranial Doppler Sonography for the diagnosis of Brain

Death: Analysis of the inter-examiner reliability of detecting cerebral circulatory arrest. *Intensive Care Medicine* 2010;36 (Suppl.2):205-325.

240. Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, Latronico N, Rasulo FA, Wijidicks EF. The case against confirmatory tests for determining brain death in adults. *Neurology*. 2011 Feb 1;76(5):489; author reply -90.

241. Guideline three: minimum technical standards for EEG recording in suspected cerebral death. American Electroencephalographic Society. *J Clin Neurophysiol*. 1994 Jan;11(1):10-3.

242. Marin-Caballós AJ, Murillo-Cabezas F, Cayuela-Dominguez A, Dominguez-Roldán JM, Rincon-Ferrari MD, Valencia-Anguita J, et al. Cerebral perfusion pressure and risk of brain hypoxia in severe head injury: a prospective observational study. *Crit Care*. 2005;9(6):R670-6.

243. Marin-Caballós AJ, Murillo-Cabezas F, Dominguez-Roldán JM, Leal-Noval SR, Rincon-Ferrari MD, Muñoz-Sánchez MA. [Monitoring of tissue oxygen pressure (PtiO₂) in cerebral hypoxia: diagnostic and therapeutic approach]. *Med Intensiva*. 2008 Mar;32(2):81-90.

244. Vassalotti JA, Stevens LA, Levey AS. Testing for chronic kidney disease: a position statement from the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis*. 2007 Aug;50(2):169-80.

245. Rainey T, Lesko M, Sacho R, Lecky F, Childs C. Predicting outcome after severe traumatic brain injury using the serum S100B biomarker: results using a single (24h) time-point. *Resuscitation*. 2009 Mar;80(3):341-5.

246. Müller K, Elverland A, Romner B, Waterloo K, Langbakk B, Unden J, et al. Analysis of protein S-100B in serum: a methodological study. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(9):1111-4.

247. Hallen M, Carlhed R, Karlsson M, Hallgren T, Bergenheim M. A comparison of two different assays for determining S-100B in serum and urine. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(7):1025-9.

248. González-Mao MC, Reparaz-Andrade A, Del Campo-Pérez V, Álvarez-García E, Vara-Pérez C, Andrade-Olivie MA. Model predicting survival/exitus after traumatic brain injury: biomarker S100B 24h. *Clin Lab*. 2011;57(7-8):587-97.

249. da Rocha AB, Schneider RF, de Freitas GR, Andre C, Grivicich I, Zanoni C, et al. Role of serum S100B as a predictive marker of fatal outcome following isolated severe head injury or multitrauma in males. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(10):1234-42.

250. Gazzolo D, Vinesi P, Bartocci M, Geloso MC, Bonacci W, Serra G, et al. Elevated S100 blood level as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants. Correlation with cerebral Doppler velocimetry. *J Neurol Sci*. 1999 Nov 15;170(1):32-5.

251. Nylen K, Ost M, Csajbok LZ, Nilsson I, Hall C, Blennow K, et al. Serum levels of S100B, S100A1B and S100BB are all related to outcome after severe traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2008 Mar;150(3):221-7; discussion 7.
252. Korfiatis S, Stranjalis G, Boviatsis E, Psachoulia C, Jullien G, Gregson B, et al. Serum S-100B protein monitoring in patients with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med*. 2007 Feb;33(2):255-60.
253. Gazzolo D, Di Iorio R, Marinoni E, Masetti P, Serra G, Giovannini L, et al. S100B protein is increased in asphyxiated term infants developing intraventricular hemorrhage. *Crit Care Med*. 2002 Jun;30(6):1356-60.
254. Nagdyman N, Komen W, Ko HK, Muller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res*. 2001 Apr;49(4):502-6.
255. Risso FM, Serpero LD, Zimmermann LJ, Gavilanes AW, Frulio R, Michetti F, et al. Perinatal asphyxia: kidney failure does not affect S100B urine concentrations. *Clin Chim Acta*. 2012 Jan 18;413(1-2):150-3.
256. Kleine TO, Benes L, Zofel P. Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Res Bull*. 2003 Aug 15;61(3):265-79.
257. Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Liska J, Settergren G, Vaage J. Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources. *Ann Thorac Surg*. 2001 May;71(5):1512-7.
258. Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemela O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma*. 2004 Jun;56(6):1229-34; discussion 34.
259. Kompanje EJ, de Groot YJ, Bakker J. Is organ donation from brain dead donors reaching an inescapable and desirable nadir? *Transplantation*. 2011 Jun 15;91(11):1177-80.
260. Meers C, Van Raemdonck D, Van Gelder F, Van Hees D, Desschans B, De Roey J, et al. Change in donor profile influenced the percentage of organs transplanted from multiple organ donors. *Transplant Proc*. 2009 Mar;41(2):572-5.
261. Leal-Noval SR, Cayuela A, Arellano-Orden V, Marin-Caballo A, Padilla V, Ferrandiz-Millon C, et al. Invasive and noninvasive assessment of cerebral oxygenation in patients with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med*. 2010 Aug;36(8):1309-17.
262. The Brain Trauma Foundation TAAoNS, The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. . Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury. . *J Neurotrauma*. 2007;24(3rd edition):S1-S106.
263. Siminoff LA, Gordon N, Hewlett J, Arnold RM. Factors influencing families' consent for donation of solid organs for transplantation. *JAMA*. 2001 Jul 4;286(1):71-7.

264. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000 Dec;232(6):804-13.
265. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19):2426-33.
266. Koudstaal LG, t Hart NA, Ottens PJ, van den Berg A, Ploeg RJ, van Goor H, et al. Brain death induces inflammation in the donor intestine. *Transplantation.* 2008 Jul 15;86(1):148-54.
267. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HG, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation.* 2004 Oct 15;78(7):978-86.
268. Iznerowicz A, Chudoba P, Kaminska D, Koscielska-Kasprzak K, Drulis-Fajdasz D, Halon A, et al. Duration of brain death and cold ischemia time, but not warm ischemia time, increases expression of genes associated with apoptosis in transplanted kidneys from deceased donors. *Transplant Proc.* 2011 Oct;43(8):2887-90.
269. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem.* 2002 Jun;48(6 Pt 1):950-2.