



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

Barcelona, 2021

NOVES ESTRATÈGIES PER A LA PREDICCIÓ I PREVENCIÓ DE LA PNEUMÒNIA ASSOCIADA A L'ICTUS

JÚLIA FAURA LLORENS

Doctorat en Neurociències

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Laboratori d'Investigació Neurovascular

Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

DIRECTORS:

Dr. Alejandro Bustamante Rangel

Dr. Joan Montaner Villalonga

TUTOR:

Dr. Joan Montaner Villalonga

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat al Laboratori d'Investigació Neurovascular (LIN) del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR).

El Laboratori d'Investigació Neurovascular forma part de la xarxa d'investigació INVICTUS+ (RD16/0019) i està parcialment finançat pel Fons d'Investigacions Sanitàries (PI17/02130), per la Fundació La Marató de TV3 (201706), i co-finançat per l'Institut de Salut Carlos III i el fons Europeu del Desenvolupament Regional (FEDER).

ÍNDIX

RESUM	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURES	5
1. INTRODUCCIÓ	9
1.1 ICTUS ISQUÈMIC.....	11
1.2 IMMUNOPATOLOGIA DE L'ICTUS.....	13
1.2.1 Resposta immunològica a nivell local.....	13
1.2.2 Immunosupressió induïda per l'ictus.....	15
1.2.3 Dany pulmonar després de l'ictus.....	17
1.3 COMPLICACIONS ASSOCIADES A L'ICTUS.....	18
1.3.1 Infeccions associades a l'ictus.....	19
1.3.2 Pneumònia associada a l'ictus.....	20
1.3.2.1 Definició i diagnòstic.....	20
1.3.2.2 Factors de risc.....	22
1.3.2.3 Tractament.....	22
1.3.2.4 Teràpies preventives.....	23
1.3.2.4.1 Antibiòtics profilàctics.....	23
1.3.2.4.2 Immunomoduladors.....	24
1.4 BIOMARCADORS EN L'ICTUS.....	27
1.4.1 Biomarcadors per a les infeccions associades a l'ictus.....	27
1.4.2 Estratègies de descobriment de nous biomarcadors.....	28
1.4.2.1 Transcriptòmica.....	29
1.4.2.2 Proteòmica.....	30
2. OBJECTIUS	33
3. MATERIAL I MÈTODES	37
3.1 ESTUDIS CLÍNICS.....	39
3.1.1 Estudi clínic 1.....	39
3.1.1.1 Disseny experimental.....	39
3.1.1.2 Participants de l'estudi.....	39
3.1.1.3 Recollida de sang.....	40
3.1.1.4 Mesura de biomarcadors.....	40
3.1.1.5 Anàlisis estadístics.....	41
3.1.2 Estudi clínic 2.....	42

3.1.2.1 Disseny experimental	42
3.1.2.2 Participants de l'estudi.....	42
3.1.2.3 Recollida de sang	42
3.1.2.3 Separació leucocitària	43
3.1.2.4 Extracció d'ARN i proteïna	43
3.1.2.5 Fase de descobriment	44
3.1.2.5.1 Transcriptòmica	44
3.1.2.5.2 Proteòmica.....	44
3.1.2.5.3 Anàlisi bioinformàtic.....	45
3.1.2.6 Fase de qualificació	45
3.1.2.6.1 RT-qPCR	46
3.1.2.6.2 Western Blot	47
3.1.2.6.3 Anàlisis estadístics	48
3.1.3 Estudi clínic 3.....	48
3.1.3.1 Participants de l'estudi.....	48
3.1.3.2 Diagnòstic de complicacions després de l'ictus	49
3.1.3.3 Recollida de sang i mesura de biomarcadors	49
3.1.3.4 Anàlisis estadístics	50
3.2 ESTUDI EXPERIMENTAL.....	51
3.2.1 Disseny experimental	51
3.2.2 Cirurgia MCAO	51
3.2.3 Col·lecció de teixits i quantificació del volum d'infart	52
3.2.4 Quantificació de la concentració de proteïna en BALF	52
3.2.5 Avaluació de la permeabilitat pulmonar.....	53
3.2.6 Homogeneïtzació del pulmó	53
3.2.7 Caracterització proteica de BALF i pulmó	54
3.2.8 Mesura de les proteïnes per ELISA.....	54
3.2.9 Anàlisis estadístics i bioinformàtics	54
4. RESULTATS	57
CAPÍTOL I: VALIDACIÓ DE BIOMARCADORS PREDICTORS DE LA SAP EN UNA COHORT MULTICÈNTRICA DE PACIENTS.....	59
4.1.1 Anàlisi <i>interim</i>	61
4.1.2 Anàlisi de la cohort completa.....	62
4.1.2.1 Valor predictiu dels biomarcadors al T1	65
4.1.2.2 Valor predictiu dels biomarcadors al T2	65

CAPÍTOL II: TÈCNIQUES –ÒMIQUES PER AL DESCOBRIMENT DE NOUS BIOMARCADORS PER A LA SAP	69
4.2.1 Fase de descobriment	71
4.2.1.1 Anàlisi multiòmic de les cèl·lules CD3+	71
4.2.1.2 Anàlisi multiòmic de les cèl·lules CD14+	73
4.2.1.3 Anàlisi multiòmic de les cèl·lules CD16+	75
4.2.1.4 Anàlisi transcriptòmic de l'RNA de sang total	77
4.2.1.5 Diagrames de Venn.....	77
4.2.2 Fase de qualificació.....	78
4.2.1.4 Anàlisi de l'expressió dels gens seleccionats	78
4.2.1.4 Anàlisi de l'expressió de les proteïnes seleccionades	79
CAPÍTOL III: ANÀLISI RETROSPECTIU DE BIOMARCADORS SANGUÍNIS PER A LA PREDICCIÓ PRECOÇ DE COMPLICACIONS ASSOCIADES A L'ICTUS.....	81
4.3.1 Anàlisi descriptiu.....	83
4.3.2 Valor predictiu dels panells seleccionats.....	84
4.4 CAPÍTOL IV: AVALUACIÓ DEL DANY PULMONAR DESPRÉS DE LA ISQUÈMIA CEREBRAL EN RATOLINS	89
4.4.1 Avaluació de les alteracions al BALF després de la isquèmia cerebral.....	91
4.4.2 Caracterització de l'expressió proteica de pulmó.....	93
4.4.3 Avaluació de la permeabilitat alveolo-capil·lar	96
5. DISCUSSIÓ	97
5.1 MR-proADM, CRP i SAA per a la predicció de la SAP	99
5.2 Estudi de subpoblacions leucocitàries per a la identificació de nous biomarcadors per a la SAP	101
5.3 Biomarcadors sanguinis per a la predicció de complicacions associades a l'ictus a l'ingrés	105
5.4 Implicació de les alteracions pulmonars després de la isquèmia cerebral en la SAP.....	108
5.5 Discussió global i perspectives de futur	112
6. CONCLUSIONS	115
7. BIBLIOGRAFIA	119
8. ANNEX	137
Blood Biomarker Panels for the Early Prediction of Stroke-Associated Complications. <i>Faura et al. J Am Heart Assoc. 2021; 10:e018946</i>	139
Stroke-induced immunosuppression: implications for the prevention and prediction of post-stroke infections. <i>Faura et al. J Neuroinflammation. 2021; 18:127</i>	149
CARRERA CIENTÍFICA DE LA DOCTORANDA.....	165

RESUM

La pneumònia associada a l'ictus (SAP, *stroke-associated pneumonia*) és una de les complicacions més freqüents després de l'ictus, amb una incidència del 12%, i augmenta el risc de mortalitat i discapacitat dels pacients amb ictus, així com la durada de la seva estada a l'hospital. Els factors que la causen són tant clínics (disfàgia, comorbiditats, alta exposició a microorganismes per hospitalització) com biològics, degut a la immunosupressió sistèmica que es dona després de l'ictus i que fa als pacients més susceptibles a patir infeccions.

Aquesta tesi pretén estudiar la SAP des de diferents punts de vista, buscant noves estratègies per a la seva predicció i prevenció. Consta de 4 objectius, cadascun dels quals s'ha intentat assolir amb un estudi independent.

El primer objectiu és el d'avaluar biomarcadors descrits a la literatura prèvia en un estudi prospectiu multicèntric, i les proteïnes SAA, CRP i MR-proADM han estat els biomarcadors seleccionats que han format panells amb alta sensibilitat per a la predicció i diagnòstic de la SAP, i que han millorat el model de regressió logística amb les variables clíniques rellevants. Tot i així, el poder predictiu d'aquests panells no és òptim, i és per això que es necessita descobrir nous biomarcadors per a la SAP. En això s'han centrat el segon i tercer objectiu d'aquesta tesi.

El segon objectiu consistia en el descobriment de nous biomarcadors predictors de la malaltia mitjançant l'ús de tècniques òmiques per a l'estudi de les 3 subpoblacions leucocitàries majoritàries en pacients que desenvolupen SAP. S'han descrit els neutròfils com a la subpoblació amb més alteracions en la seva expressió gènica i proteica. A més, s'han seleccionat alguns candidats interessants, com S100A8 o S100A12, però és necessària la seva validació en nous pacients i per altres tècniques.

El tercer objectiu s'ha basat en l'anàlisi retrospectiu de biomarcadors sanguinis per a la predicció de dues complicacions associades a l'ictus amb símptomes comuns com són la insuficiència cardíaca aguda descompensada (ADHF, *acute decompensated heart failure*) i les infeccions de tracte respiratori (que inclouen la SAP). S'han identificat dos panells diferents de 3 biomarcadors cadascun, que eren capaços de millorar de manera significativa el model de regressió logística corresponent amb les variables clíniques.

Per últim, en el quart objectiu s'ha volgut avaluar l'afectació que pateix el pulmó després de la isquèmia cerebral. Per aquest motiu, s'ha realitzat un estudi experimental en un

model d'isquèmia cerebral de ratolí, i s'ha observat un increment d'un marcador de dany pulmonar com és l'augment de concentració de proteïna al fluid del rentat broncoalveolar (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*), així com la identificació de 3 molècules alterades a nivell pulmonar per la isquèmia cerebral com són HGF, TGF- α i CCL2.

La troballa de biomarcadors predictors de la SAP, així com el coneixement en profunditat dels processos moleculars que es donen a nivell sistèmic després de l'ictus isquèmic pot tenir implicacions clíniques molt importants com són el descobriment de noves dianes terapèutiques per a la prevenció de la SAP o la selecció d'un grup de pacients amb alt risc de desenvolupar-la, aconseguit així reduir les taxes de mortalitat i discapacitat dels pacients amb ictus.

ABSTRACT

Stroke-associated pneumonia (SAP) is one of the most common complications after stroke, with a frequency of 12%. It increases the risk of mortality and disability of stroke patients, as well as the length of stay at the hospital. The factors that lead to SAP are both clinical (dysphagia, comorbidities, high exposure to microorganisms) and biological, due to the systemic immunosuppression that occurs after a stroke, making these patients more prone to suffer infections.

This doctoral thesis intends to study SAP from different points of view, searching for novel strategies for its prediction and prevention. It comprises 4 objectives, and each of them has been explored in an independent study.

The first objective aims to evaluate biomarkers previously described in the literature in a prospective multicentric study. The selected biomarkers have been SAA, MR-proADM, and CRP, which have formed panels with high sensitivity for the prediction and early diagnosis of SAP. They have improved the logistic regression models with the relevant clinical variables. However, the predictive value of these panels is not optimal,

The second objective consisted in the discovery of new biomarkers for the prediction of SAP through the use of -omics for the study of 3 leukocyte subpopulations. Neutrophils are the subpopulation that suffers more alterations at gene and protein levels in SAP patients. Furthermore, some interesting candidates have been explored, as S100A8 or S100A12, but it is needed their validation in new patients and using different techniques.

The third objective is based on a retrospective analysis of blood biomarkers for the prediction of two stroke-associated complications with common symptoms as acute decompensated heart failure (ADHF) and respiratory tract infections (which include SAP). Two different panels have been identified, with 3 biomarkers each, which were able to improve significantly the corresponding logistic regression models with clinical variables.

Last but not least, the fourth objective has evaluated the alterations that cerebral ischemia causes to the lungs. For this reason, an experimental study has been performed, using a model of cerebral ischemia in mice. It has been observed an increase of a marker of lung damage (higher levels of protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid). In addition, 3 molecules have been identified as altered at a pulmonary level after the cerebral ischemia: HGF, CCL2, and TGF- α .

The finding of predictive biomarkers for SAP, as well as the deeper knowledge of the molecular processes that occur systemically after an ischemic stroke, can have important clinical implications. These implications could be the discovery of new therapeutic targets for the prevention of SAP and the selection of those patients at higher risk of developing SAP. With this, it could be possible to reduce the mortality and disability rates of stroke patients.

ABREVIATURES

ADHF	<i>acute decompensated heart failure</i>
ALI	<i>acute lung injury</i>
ANS	<i>autonomic nervous system</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	<i>adenosin triphosphate</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
BALF	<i>brochoalveolar lavage fluid</i>
BBB	<i>blood-brain barrier</i>
CBF	<i>cerebral blood flow</i>
CI	<i>confidence interval</i>
CL	<i>contralateral</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CV	<i>cross-validation</i>
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor receptor</i>
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FDR	<i>false discovery ratio</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GROA	<i>growth-related oncogene-α</i>
HPA	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
HRTCT	<i>thorax high-resolution computed tomography</i>

Hsp70	<i>heat shock 70 kDa protein-8</i>
IFN- γ	<i>interferon- γ</i>
IGFBP3	<i>insulin-like growth factor-binding protein-3</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iNKT	<i>hepatic invariant natural killer T</i>
IP	<i>ipsilateral</i>
IQR	<i>interquartile range</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography MS</i>
logFC	<i>logarithmic fold-change</i>
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen-activated kinase</i>
MCA	<i>middle cerebral artery</i>
MCAO	<i>occlusion of the MCA</i>
mRS	<i>modified Rankin Scale</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
NCAM	<i>neuron cell adhesion molecule</i>
NIHSS	<i>National Institute of Health Stroke Scale</i>
NLR	<i>neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>
NT-proBNP	<i>N-terminal pro-B-type natriuretic peptide</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCT	<i>procalcitonin</i>

PEA	<i>proximity extension assay</i>
PMNs	<i>polymorfonuclear cells</i>
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PNS	<i>parasympathetic nervous system</i>
POCT	<i>point-of-care testing</i>
PRRs	<i>pathogen recognition receptors</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RMA	<i>robust multi-array average</i>
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RTI	<i>respiratory tract infection</i>
r-tPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
S100B	<i>S100 calcium-binding protein B</i>
SAA	<i>serum amyloid A</i>
SAI	<i>stroke-associated infection</i>
SAP	<i>stroke-associated pneumònia</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SIIS	<i>stroke induced immunosuppression</i>
SNS	<i>sympathetic nervous system</i>
TBI	<i>traumatic brain injury</i>
TBI	<i>traumatic brain injury</i>
Th	<i>T-helper</i>

TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor-1</i>
TNK	<i>tenecteplase</i>
TTC	<i>triphenyltetrazolium chloride</i>
VAP-1	<i>vascular adhesion protein-1</i>
vWF	<i>von Willebrand factor</i>
WBC	<i>white blood cell</i>
α -GalCer	<i>α-galactosylceramide</i>

1. INTRODUCCIÓ

1.1 ICTUS ISQUÈMIC

L'ictus es pot definir com l'aparició sobtada d'una pèrdua focal de funcions neurològiques degut a una isquèmia o una hemorràgia en una zona del cervell [1].

A la Unió Europea, l'ictus és la segona causa de mort (460.000 morts al 2017) i la primera causa de discapacitat, afectant a més d'1 milió de persones cada any. La tendència d'aquesta malaltia va a l'alça, estimant-se un increment en la prevalença de l'ictus del 27% d'aquí a 2047 [2]. Més concretament, al 2015 a Espanya hi va haver una incidència de 46.2 ictus per cada 100.000 habitants (ajustant per sexe i edat). A més, el cost econòmic de la malaltia és molt elevat, causant uns costos directes d'atenció sanitària d'uns 20 bilions d'euros anuals i, sumats als costos no relacionats amb l'atenció sanitària, el cost total ascendeix fins als 45 bilions d'euros [3].

En l'ictus isquèmic es produeix per una oclusió d'una artèria del cervell. Per altra banda, l'ictus hemorràgic és causat per una ruptura d'un vas sanguini del cervell. L'ictus isquèmic és més freqüent, donant-se en un 87% dels casos, mentre que l'ictus hemorràgic es troba en una freqüència aproximada del 13% [4]. Aquesta tesi doctoral es centrarà en l'ictus isquèmic, de manera que a partir d'ara els termes ictus i ictus isquèmic s'utilitzaran indistintament.

Respecte el diagnòstic de l'ictus, es fa en combinació entre paràmetres clínics i radiològics. Les escales prehospitalàries s'empren per a la identificació de quadres clínics sospitosos d'ictus. Un exemple és l'escala prehospitalària de Cincinnati, la qual es basa en 3 ítems: debilitat facial, caiguda del braç i trastorn en el llenguatge [5]. Si es confirma com a mínim un dels 3, es considera sospita d'ictus. A Catalunya, s'ha desenvolupat l'acrònim RAPID (Rigui, Aixequi, Parli, Ictus, De Pressa) [6], basant-se en aquesta escala i en l'escala FAST (de l'anglès *Face, Arm, Speech, Time*) [7], com a escala prehospitalària i també com a mesura de sensibilització i conscienciació de la població general.

Pel que fa a la neuroimatge, s'utilitzen tant la tomografia computeritzada com la ressonància magnètica cranial. Ambdues tècniques, combinades amb noves tècniques de neuroimatge multimodal, permeten fer una avaluació detallada de l'estat de la circulació cerebral, facilitant el diagnòstic de l'ictus isquèmic durant la fase aguda i podent diferenciar-lo de patologies amb símptomes clínics similars als de l'ictus (anomenades *mimics*) [8], a més de permetre la planificació dels tractaments de reperfusió.

La detecció precoç de l'ictus és molt important per al seu tractament, i actualment, en la pràctica clínica s'empren dos tipus de tractament diferents. Per una banda, l'única estratègia farmacològica eficaç és el tractament trobolític amb l'activador tissular del plasminogen recombinant (r-tPA). El fàrmac s'administra per via intravenosa, amb la intenció de dissoldre el coàgul que taponava l'artèria cerebral, permetent així la recanalització del vas. Aquest tractament, però, té una limitació molt important, i és que només es pot administrar durant les primeres 4,5 hores des de l'aparició dels símptomes. A més, està relativament contraindicat en pacients majors de 80 anys i/o que prenguin medicaments anticoagulants. La seva administració fora d'aquestes condicions augmenta el risc de transformacions hemorràgiques [4]. En els últims anys està sorgint la tenecteplase (TNK) com a alternativa al r-tPA en els pacients amb oclusió de gran vas, i fins i tot en un meta-anàlisi recent s'ha observat que els pacients que rebien TNK tenien una millor recanalització que aquells que rebien r-tPA [9].

Per altra banda, la trombectomia endovascular mecànica ha sorgit en els últims anys com una estratègia terapèutica per a la recanalització del vas obstruït en els casos d'obstrucció de gran vas, com a alternativa però també en conjunció amb el r-tPA. Aquesta nova eina ha permès ampliar la finestra terapèutica de manera que, en alguns casos, els pacients es poden beneficiar d'aquesta estratègia fins a 24h després de l'inici dels símptomes de l'ictus. També s'ha vist s'assoleix una major taxa de recanalització i un millora el pronòstic dels pacients quan aquests són sotmesos a la recanalització mecànica, tant primària com després de l'administració de rt-PA [10].

El pronòstic de l'ictus es pot entendre des de diversos punts de vista complementaris, i es pot mesurar per mitjà de diverses escales. Per tal d'avaluar l'estat neurològic del pacient i la gravetat del dany cerebral, l'escala més utilitzada és la escala d'ictus del National Institutes of Health (NIHSS, *National Institute of Health Stroke Scale*), que consta de 15 ítems relacionats amb els símptomes neurològics dels pacients i una puntuació que oscil·la des del 0 (cap símptoma) fins al 42 (gravetat severa). Un neuròleg format en aquesta escala avalua al pacient abans i després de les teràpies de reperfusió i usualment cada 24 hores en els primers dies després de l'ictus [11].

El pronòstic d'un pacient amb ictus també es pot avaluar des del punt de vista funcional. En aquest sentit, l'escala de Rankin modificada (mRS, *modified Rankin Scale*) és la més àmpliament utilitzada, i mesura el grau de dependència de la persona a l'hora de realitzar les activitats bàsiques del dia a dia, essent 0 no tenir cap símptoma i 6 la mort del pacient. Una puntuació de 2 o menys es considera que el pacient és independent per a les

activitats de la vida diària, i de més de 2 punts es considera una persona dependent [12]. S'acostuma a utilitzar a l'alta del pacient i als 3 i 6 mesos després de l'episodi, per tal de fer-ne un seguiment funcional. Es calcula que entre un 40-60% dels pacients que pateixen un ictus moriran en els 5 anys posteriors a l'esdeveniment [13–15]. Per altra banda, d'entre aquells pacients que sobrevisquin, el 35-50% presentaran discapacitat [16,17].

1.2 IMMUNOPATOLOGIA DE L'ICTUS

L'oclusió d'un vas sanguini al cervell provoca una interrupció del flux sanguini a la zona irrigada per aquell vas. Per aquest motiu, s'activen una sèrie de mecanismes fisiopatològics a nivell local i sistèmic. Es aquesta tesi ens centrarem en aquells fenòmens de caire immunològic.

1.2.1 Resposta immunològica a nivell local

La interrupció del flux sanguini en una zona del cervell, provocada per l'ictus, porta a un ambient d'hipòxia i de privació de glucosa, comportant una reducció dels mecanismes de síntesi d'adenosina trifosfat (ATP, *adenosin triphosphate*) i d'eliminació de glutamat. Això fa que hi hagi una estimulació constant dels receptors de glutamat NMDA de la zona infartada, causant una despolarització constant de les neurones, una generació d'espècies d'oxigen reactiu (ROS, *reactive oxygen species*) i disfunció mitocondrial. Això últim acaba provocant l'activació de vies de necrosi i apoptosi [18].

Les cèl·lules danyades i les mortes alliberen patrons moleculars associats al dany (DAMPs, *damage associated molecular patterns*), que són reconeguts per receptors de reconeixement de patògens (PRRs, *pathogen recognition receptors*) de la micròglia resident, com toll-like receptor (TLR) 2 i TLR 4. Aquests receptors activen vies de senyalització com la nuclear factor- κ B i la de la quinasa activada per mitògens (MAPK, *mitogen-activated kinase*). Aquestes vies estimulen la producció de citocines proinflamàtores (interleucina-(IL, *interleukin*) 1 β , IL-6 i factor de necrosi tumoral-(TNF-, *tumor necrosis factor*) α), quimiocines, integrines i molècules d'adhesió [19,20].

L'efecte combinat de l'alliberament de mediadors inflamatoris, l'estrès oxidatiu i altres factors, com la regulació a la baixa de proteïnes d'unió endotelials, causa un increment en la permeabilitat de la barrera hemato-encefàlica (BBB, *blood-brain barrier*), facilitant

la infiltració de leucòcits [21]. Aquests leucòcits migren al cervell amb l'objectiu d'eliminar els *debris* cel·lular, i facilitar així la neuroregeneració a la zona infartada. La representació de la cascada inflamatòria aquí mencionada es pot trobar a la **figura 1**.

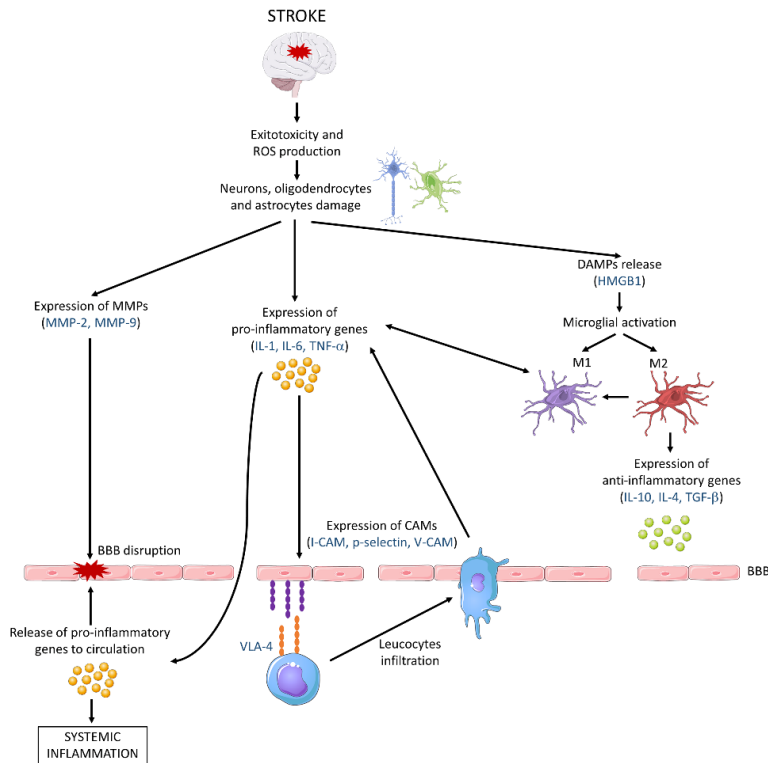


Figura 1. Cascada inflamatòria després de l'ictus. CAM: *cellular adhesion molecule*; HMGB1: *high-mobility group box 1*; MMP: *matrix metalloproteinase*; V-CAM: *vascular cell adhesion molecule*; VLA: *very late antigen*. Les abreviacions que no es troben en aquest peu de figura, es poden trobar a l'apartat d'abreviacions de l'annex d'aquesta tesi. Adaptat de Ramiro et al. (2018) [20].

Les primeres cèl·lules en ser reclutades són els monòcits i els neutròfils, en les primeres 24 hores després de la isquèmia, seguits pels limfòcits, que arriben al cervell entre 2 i 3 dies després de l'episodi [22].

Tot i que el rol dels leucòcits infiltrats és d'ajudar a la neuroregeneració, també produeixen un efecte advers en la zona infartada, ja que augmenten la producció de ROS i altres mediadors pro-inflamatoris, actuant de manera inespecífica sobre diferents tipus cel·lulars que es troben a la zona afectada. Això acaba comportant una exacerbació del dany cel·lular i la propagació de la lesió cerebral [23].

1.2.2 Immunosupressió induïda per l'ictus

L'augment de la permeabilitat de la BBB provoca un alliberament d'antígens i mediadors pro-inflamatoris al torrent sanguini, provocant un cert estat d'inflamació sistèmica. Tot i així, a les poques hores després de l'ictus, ja s'observa un canvi en aquest estat i una immunosupressió del sistema immunitari perifèric, probablement com a mesura compensatòria de la inflamació sistèmica, tot i que encara no n'està del tot clara la causa. Aquest fenomen s'anomena típicament immunosupressió induïda per l'ictus (SIIS, *stroke induced immunosuppression*). Alguns dels processos més destacats de la SIIS estan representats a la **figura 2** [24].

Un dels processos principals que es dona en la SIIS és el canvi de fenotip dels limfòcits T, passant d'un fenotip T-*helper* (Th) 1 a un fenotip Th2. Els dos fenotips es diferencien, entre altres coses, per tenir un perfil de secreció de citocines diferent. Les cèl·lules Th1 secreten citocines pro-inflamatòries com TNF- α i interferó- γ (IFN- γ , *interferon- γ*), mentre que les Th2 secreten citocines típicament antiinflamatòries com IL-10 i IL-4, entre d'altres. Aquest canvi de fenotip, per tant, es caracteritza per un increment en la ratio de citocines típiques de cèl·lules Th2 respecte a les citocines típicament expressades per les cèl·lules Th1. Un altre tret característic de la SIIS és la limfopènia a la sang, melsa i nòduls limfàtics [19].

Diversos estudis han reportat una reducció en la producció de IFN- γ i en la secreció de TNF- α en mostres sanguínies de ratolins sotmesos a una oclusió de l'arteria cerebral mitja (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*), així com un increment dels nivells circulants d'IL-10 [25,26]. Aquest mateix patró d'expressió de citocines circulants s'ha observat en pacients amb ictus, entre els dies 1 i 3 després de l'ictus [27]. Com s'ha comentat anteriorment, el canvi de fenotip està associat amb una reducció del nombre de limfòcits a diferents òrgans així com al torrent sanguini, i sembla ser degut a un increment en l'apoptosi a aquests òrgans [25]. En conseqüència, diversos estudis han reportat una disminució en el volum de la melsa tant en ratolins MCAO com en humans amb ictus [26,28,29].

Aquests processos semblen estar mediat pel sistema nerviós autònom (ANS, *autonomic nervous system*), especialment pel sistema nerviós simpàtic (SNS, *sympathetic nervous system*). Les catecolamines són mediadors del SNS que se secreten quan aquest sistema està activat. Actuen a través de receptors β -adrenèrgics, inhibint la secreció de IFN- γ i estimulant la producció de IL-10, entre d'altres accions [30].

En ratolins sotmesos a MCAO, s'ha observat un augment d'algunes catecolamines. A més, el tractament amb propranolol (beta-bloquejant que inhibeix parcialment el SNS) en aquests animals comporta un increment en els nivells de IFN- γ i una baixada en els de IL-10 i de catecolamines, a part d'un increment en el volum de la melsa [26]. Degut a aquest tractament, també s'ha observat una reducció de les infeccions bacterianes i una millora de la supervivència en els animals MCAO tractats [25]. El sistema nerviós parasimpàtic (PNS, *parasympathetic nervous system*), l'altra divisió del ANS, també sembla prendre part de la SIIS. Tant el nervi vague com l'acetilcolina tenen un rol important en aquest sistema, i suprimeixen la secreció de citocines proinflamatòries. L'activitat d'aquest sistema sembla incrementar-se després de l'ictus, i tant la secció del nervi vague com la inhibició dels receptors d'acetilcolina causen una baixada de la càrrega bacteriana en els pulmons dels animals MCAO quan es comparen amb els animals MCAO *wild type* [31,32].

L'activació de l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (HPA, *hypothalamic-pituitary-adrenal*) que es dona després de l'ictus, amb la secreció de glucocorticoides, estimula la secreció de citocines antiinflamatòries, de manera similar al que succeeix amb les catecolamines. Així doncs, la inhibició de l'eix HPA en ratolins MCAO també comporta una reducció en l'apoptosi dels limfòcits i uns nivells més alts en el comptatge d'aquestes cèl·lules. Tot i així, no s'observa una reducció de les infeccions bacterianes en aquests animals, suggerint que el rol de l'eix HPA podria no ser tan rellevant en la SIIS com ho és el SNS [25].

Altres mecanismes independents de l'ANS semblen contribuir també a la SIIS. Com a exemple, les cèl·lules natural killers T invariants hepàtiques (iNKT, *hepatic invariant natural killer T*) produeixen grans quantitats de IL-10. La immunomodulació d'aquestes cèl·lules amb α -galactosylceramide (α -GalCer) té un efecte similar al tractament amb propranolol [33]. Les cèl·lules del sistema immune innat com els monòcits i els neutròfils també es veuen afectades després de l'ictus, ja que els mecanismes relacionats amb l'eliminació de bacteris, com l'esclat oxidatiu i la NETosis, es veuen minvats, contribuint així a la SIIS [34,35].

Una de les conseqüències clíniques més directes de la SIIS és la major susceptibilitat dels pacients a patir infeccions en els primers dies després de l'ictus. Això es desenvoluparà amb més profunditat en els apartats 1.3.2 i 1.3.3 d'aquesta tesi.

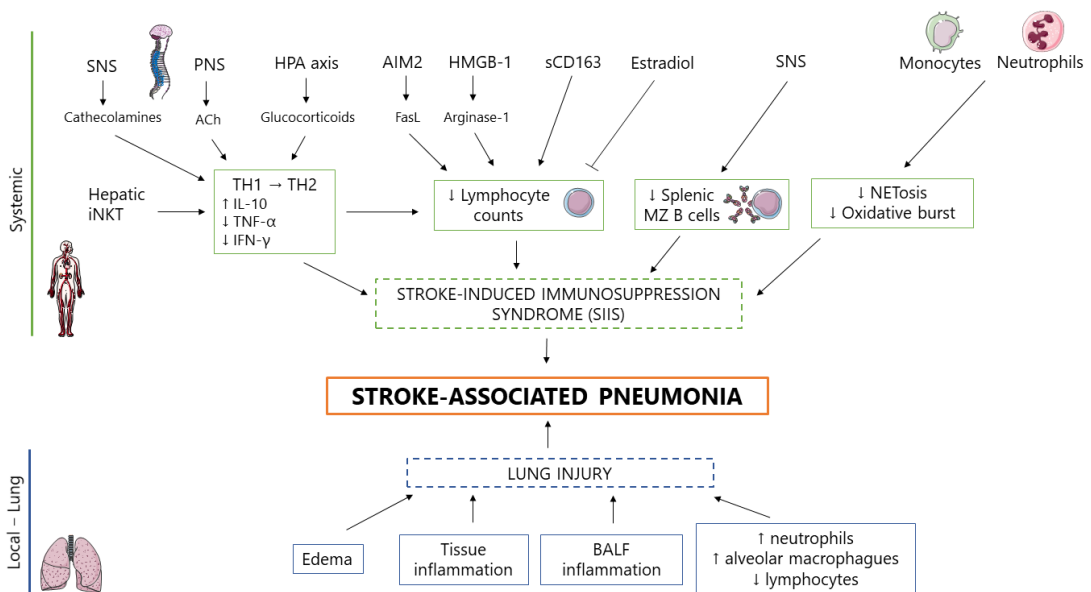


Figura 2. Processos biològics que contribueixen als pacients amb ictus a tenir una alta susceptibilitat de patir infeccions associades a l'ictus, més concretament pneumònia. Extret de Faura et al. (2021) [24].

1.2.3 Dany pulmonar després de l'ictus

Després d'una lesió cerebral com és l'ictus o altres com el traumatisme cranioencefàlic (TBI, *traumatic brain injury*) o l'hemorràgia subaracnoidea, s'observa una alta incidència d'afectacions pulmonars, com poden ser la pneumònia, la lesió pulmonar aguda (ALI, *acute lung injury*), el síndrome del destret respiratori agut (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) o l'edema pulmonar neurogènic [36,37]. De manera similar al que succeeix en l'ictus, després del TBI s'observa una immunosupressió sistèmica.

Aquesta alta incidència d'afectacions pulmonars després d'una lesió cerebral porta a pensar que hi ha una interacció molt estreta entre el cervell i el pulmó després de l'episodi lesiu. Aquesta interacció sembla ser bidireccional, i s'ha proposat el model *double hit* (doble impacte) com a explicació dels mecanismes que es donen en aquesta interacció, tot i que aquests mecanismes encara no es coneixen en profunditat. Segons aquest model, el primer impacte després de la lesió cerebral seria la secreció de citocines proinflamatòries al cervell, l'alteració de la BBB i l'activació del sistema nerviós central. Això comporta diverses alteracions sistèmiques que provoquen dany local a diferents òrgans perifèrics, com els pulmons. Aquest dany local, per la seva banda, provoca una exacerbació de la lesió cerebral i suposaria el segon impacte del model [38].

L'efecte específic de l'ictus al pulmó s'ha començat a estudiar recentment. En un model experimental d'isquèmia cerebral en rates, es va observar tant edema pulmonar com canvis ultraestructurals al parènquima cerebral després de la isquèmia. A més a més, els nivells de citocines proinflamatòries com IL-6 i TNF- α es trobaren elevats tant en plasma, en cervell i en el fluid del rentat broncoalveolar (BALF, *brochoalveolar lavage fluid*) [39].

Per contra, en ictus experimental en ratolins, Austin et al. [40] no van observar que aquests animals patissin lesions pulmonars (ni edema, ni afectació a la funcionalitat pulmonar) després de la isquèmia, tot i que sí que van observar inflamació en aquest òrgan, a través de l'expressió de citocines pro-inflamatòries tant al teixit pulmonar com al BALF.

Respecte al nínxol immunològic del pulmó, s'ha descrit una alteració d'aquest després de la isquèmia cerebral, amb una disminució dels limfòcits i un augment dels macròfags alveolars i dels neutròfils [41]. Tot i així, el perfil d'expressió de citocines i quimiocines en el pulmó i en el BALF que s'observa en aquest estudi varia respecte a l'observat en els dos estudis mencionats anteriorment.

Aquestes afectacions a nivell de pulmó després de l'ictus, podrien també contribuir a la susceptibilitat d'aquests pacients a patir pneumònies en els primers dies després de l'episodi isquèmic, tal i com succeeix en la SIRS. Un resum de tots aquests processos biològics està representat a la **figura 2**.

1.3 COMPLICACIONS ASSOCIADES A L'ICTUS

Després de l'ictus, es poden donar una sèrie de complicacions que comporten un empitjorament del pronòstic dels pacients. Aquestes complicacions poden donar-se en la fase aguda de l'ictus, com la transformació hemorràgica (TH), però també es poden donar en la fase subaguda de la malaltia, entre les 4.5-8 hores i unes poques setmanes després de l'episodi isquèmic [42].

En aquesta fase subaguda, les complicacions es poden considerar neurològiques, com podrien ser convulsions o epilèpsia. La resposta inflamatòria local que es dona després de l'ictus provoca la disrupció de la BBB, com s'ha comentat a l'apartat 1.2.1, facilitant les complicacions locals com la TH o l'edema cerebral. En aquesta fase subaguda de la malaltia, les complicacions també poden ser sistèmiques, que són en les que se centrà

aquesta tesi. Les complicacions sistèmiques allarguen el temps d'estada a l'hospital dels pacients, augmentant així els costos d'hospitalització. Un dels principals motius del desenvolupament d'aquestes complicacions és l'augment del to simpàtic i la subseqüent immunosupressió (comentada a l'apartat 1.2.2) [43].

1.3.1 Infeccions associades a l'ictus

Les infeccions associades a l'ictus (SAI, *stroke associated infections*) són una de les complicacions més freqüents després d'aquest. La seva freqüència s'ha estudiat en diferents meta-anàlisis, i varia entre el 21 i el 30% segons l'estudi [44,45].

Aquesta alta freqüència d'infeccions en els pacients a l'ictus és deguda a diversos factors, que contribueixen a una major susceptibilitat d'aquests pacients per a les infeccions. Aquests factors es podrien dividir en factors clínics i factors biològics (**figura 3**). El principal factor biològic ja s'ha comentat anteriorment, i seria la SIIS. Per altra banda, els factors clínics són diversos.

En primer lloc, els pacients amb ictus durant la fase aguda i subaguda de la malaltia es troben en un entorn hospitalari amb una elevada quantitat de patògens a l'ambient. A més, es troben sotmesos a diversos tractaments invasius, com pot ser la intubació endotraqueal o la cateterització, i tenen una alta predisposició a patir disfàgia i aspiració. Les diverses comorbiditats que acostumen a tenir els pacients que pateixen ictus, com pot ser la diabetis mellitus, la hipertensió o problemes pulmonars previs, també contribueixen a elevar el risc de patir infeccions [46].

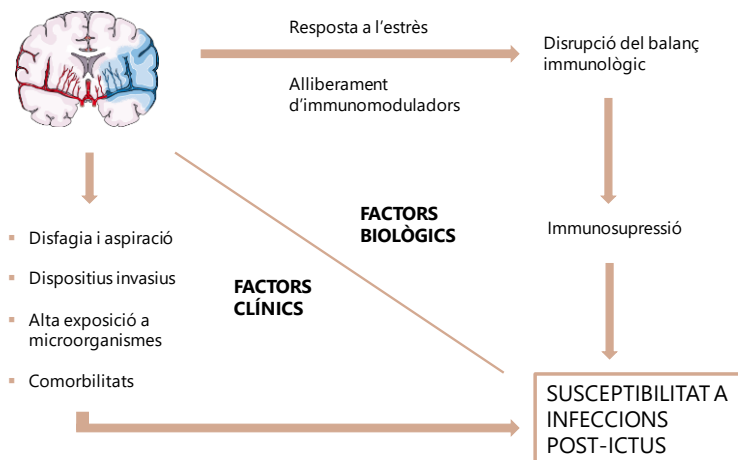


Figura 3. Factors que comporten una susceptibilitat elevada a patir infeccions els pacients amb ictus. Adaptat de Liu et al., (2018) [46].

Respecte al tipus d'infeccions, en destaquem les dues més freqüents. La infecció de tracte urinari (UTI, *urinary tract infection*) té incidència sobre els pacients amb ictus del 8% (6.68-9.26) [44]. La pneumònia, anomenada específicament pneumònia associada a l'ictus (SAP, *stroke-associated pneumonia*), és l'altra SAI més comú, amb una freqüència del 12% (95% CI 11.08-13.58) [44], i serà presentada àmpliament en l'apartat 1.3.3 d'aquesta tesi.

Les SAIs tenen un gran impacte en el pronòstic i la mortalitat dels pacients que les pateixen. Concretament, aquestes infeccions són predictors independents d'empitjorament de l'estat funcional del pacient als 3 mesos després de l'episodi, així com també de la mortalitat [47,48].

1.3.2 Pneumònia associada a l'ictus

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la pneumònia associada a l'ictus (SAP, *stroke-associated pneumonia*) és una de les infeccions associades a l'ictus més freqüents. L'últim meta-anàlisis que va estudiar la freqüència de la SAP ha reportat una freqüència del 12% (11.08-13.58). Aquesta freqüència, però, varia en funció d'on es trobi hospitalitzat el pacient, i és més baixa en aquells pacients hospitalitzats a les unitats d'ictus respecte als que es troben a sales d'hospitalització de neurologia general o els que es troben a les unitats de cures intensives [44]. A més, la taxa de SAP també varia en funció de l'estat de desenvolupament del país, essent més alta en els països de rentes baixes i mitjanes respecte als països amb rentes altes [49].

L'impacte de la SAP en la mortalitat i el pronòstic dels pacients és molt elevat. Per una banda, l'aparició de SAP incrementa el temps d'estància a l'hospital i està associada amb un pronòstic d'empitjorament funcional dels pacients tant a l'alta hospitalària com als 3 mesos després de l'episodi. A més, aquests pacients també tenen un risc més alt de mortalitat [50,51]. A nivell econòmic, l'increment del temps d'estància a l'hospital d'aquests pacients suposa una elevació del 80% del cost del pacient per als sistemes sanitaris dels països [52].

1.3.2.1 Definició i diagnòstic

El terme SAP es refereix a l'espectre de infeccions de tracte respiratori baix que es donen en els primers 7 dies després de l'ictus. Aquest terme el va definir el grup anomenat Pneumonia In Stroke ConsEnsuS (PISCES) davant la necessitat de definir una

terminologia que englobés els diferents termes que s'estaven emprant fins ara per anomenar aquesta complicació [53].

El grup PISCES es va crear l'any 2015 i està format per experts multidisciplinars en l'àmbit de la SAP d'arreu del món. El grup va sorgir de la necessitat d'establir un consens pel que fa a la definició, al diagnòstic i a la prevenció de la SAP. Durant els últims anys, diversos criteris diferents s'han emprat per al diagnòstic de la SAP [54]. Els més freqüents eren els criteris de Mann i el criteris del Centre per al Control i Prevenció de Malalties (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) [55].

Per tal d'establir uns criteris de diagnòstic unificats, el grup es va basar en els dos criteris abans mencionats per tal de crear els anomenats criteris CDC modificats. En aquest criteris (esmentats a la **taula 1**), es considera com a SAP probable si es compleixen tots els criteris però no hi ha confirmació radiològica. Si hi ha aquesta confirmació radiològica, es considera SAP definitiva [53].

Com a mínim 1 dels següents:

1. Febre (>38°C) sense cap altra causa coneguda
2. Leucopènia (<4000 leucòcits/mm³) o leucocitosis (>12000 leucòcits/mm³)
3. Per a adults ≥70 anys, estat mental alterat sense cap altra causa coneguda

Com a mínim 2 dels següents:

1. Aparició d'esput purulent, o canvi de l'esput en un període de 24 hores, o increment de secrecions respiratòries, o increment dels requeriments d'aspiració
2. Aparició o empitjorament de tos, o dispnea, o taquipnea (>25/min).
3. Roncus, crepitants o sorolls bronquials.
4. Empitjorament gasomètric.

I ≥2 radiografies toràciques seriades amb com a mínim 1 dels següents:

Infiltració, cavitació o consolidació nova o progressiva i persistent.

Nota: en pacients sense cap malaltia pulmonar o cardíaca subjacent, 1 radiografia de tòrax és suficient.

Taula 1. Criteris CDC modificats. Es considera SAP probable quan es compleixen els dos primers ítems de la taula, i SAP definitiva quan es compleixen els 3.

Actualment, aquests criteris s'estan validant clínicament, però encara no es disposa d'un *gold standard*¹ per a la SAP. Per aquest motiu, s'ha estudiat un possible rol de la tomografia computeritzada de tòrax d'alta resolució (HRTCT, *thorax high-resolution computed tomography*) en el diagnòstic de la SAP, com a complement dels criteris CDC modificats [56,57].

¹ Es considera *gold standard* aquella prova diagnòstica amb la màxima fiabilitat per al diagnòstic d'una malaltia.

Per altra banda, cal tenir també en compte que alguns dels símptomes més comuns de la SAP, com poder ser febre o dispnea, es poden trobar en altres complicacions com poden ser les cardíques, o fins i tot poder ser manifestacions clíniques del propi ictus. Les complicacions cardíques són un altre tipus de complicació sistèmica subaguda de l'ictus. S'ha observat una freqüència d'esdeveniments cardíacs en la fase subaguda de del 19% segons l'estudi VISTA [58], ja sigui per exacerbació de patologies cardíques prèvies com per la ocurrencia de nous esdeveniments. Algunes de les patologies cardíques associades a l'ictus més freqüents són l'infart de miocardi, la insuficiència cardíaca (ja sigui crònica o aguda que es descompensi) i les arítmies cardíques, entre d'altres [43]. Aquests esdeveniments s'han associat amb un increment del risc de mortalitat en els pacients amb ictus, i s'han descrit com a predictors d'empitjorament del pronòstic funcional [59,60].

1.3.2.2 Factors de risc

Hi ha certs factors de risc que fan que els pacients amb ictus que els pateixen tinguin una probabilitat més alta de desenvolupar SAP. L'edat, el sexe i la gravetat de l'ictus són 3 dels factors de risc que més influència tenen. De fet la majoria d'*scores* predictius de SAP que s'han desenvolupat, com l'ISAN o l'A2DS2, els inclouen [61]. Les comorbiditats que més s'han associat a l'aparició de SAP són la fibril·lació auricular i la malaltia pulmonar obstructiva crònica (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) [62].

La disfàgia és un altre dels factors de risc més rellevants, i consisteix en una dificultat del pacient en la deglució. Es dona de manera freqüent en els pacients amb ictus, amb una freqüència que varia entre el 28 i el 65%. Aquesta variabilitat és deguda a les diferències en l'avaluació, el temps d'aquesta i el tipus de test que s'utilitza [63]. La presència de disfàgia en els pacients amb ictus augmenta considerablement el risc de patir SAP, com s'ha observat a diversos estudis [64,65]. Com a exemple, en l'estudi PREDICT es va observar que la freqüència de SAP s'incrementava d'un 5.9% a un 18.8% si el pacient patia disfàgia en els primers dies després de l'episodi isquèmic [66].

1.3.2.3 Tractament

Per al tractament de la SAP, que habitualment té un origen bacterià, clàssicament s'han utilitzat antibiòtics d'ampli espectre, en funció de les guies clíniques recomanades per pneumònia de la comunitat (CAP, *community-acquired pneumonia*) o per pneumònia nosocomial (HAP, *hospital-acquired pneumonia*). Tot i així, hi ha molta varietat d'antibiòtics utilitzats a la pràctica clínica per combatre la SAP [67].

Això és degut, en part, a que l'etiologia microbiana de la SAP és difícil de caracteritzar i molt variada. L'obtenció de mostres directes, com esput, per a la identificació dels patògens causants de la malaltia és molt difícil degut a l'estat del pacient. A més, els mètodes de cultiu microbià utilitzats tenen una baixa sensibilitat per al diagnòstic. En els estudis on s'ha aconseguit caracteritzar l'etiologia microbiana de la SAP, s'ha observat que els microorganismes més freqüentment identificats eren els bacils gram-negatius i els cocs gram-positius [68].

El grup PISCES va proposar una sèrie de recomanacions per tal d'establir cert consens en el tractament de la SAP. Si la SAP apareix en les primeres 72 hores després de l'ictus, es recomana administrar antibiòtics que cobreixin l'espectre de la CAP. Si apareix després de les 72 hores però dins dels 7 primers dies, el grup PISCES recomana utilitzar antibiòtics, que cobreixin l'espectre de la CAP però també els bacteris coliforms. Específicament, els antibiòtics més comunament utilitzats són els β -lactàmics, en alguns casos en conjunció amb macròlids, així com les quinolones. Quan hi ha risc de *Pseudomonas aureginosa*, es recomana administrar piperacil-lina/tazobactam.

Per altra banda, si l'aparició de la pneumònia és després dels primers 7 dies, ja es considera nosocomial i es segueixen s'administren els antibiòtics recomanats per a la HAP [67].

1.3.2.4 Teràpies preventives

La reducció del nombre de casos de SAP en els pacients amb ictus suposaria un descens de la mortalitat d'aquests pacients i un risc menor de discapacitat, així com una reducció del temps d'estada a l'hospital. Per aquets motiu, en l'àmbit de recerca de la SAP s'estan invertint molts esforços en descobrir teràpies preventives contra ella. Els dos tractaments més estudiats han estat l'administració d'antibiòtics profilàctics i la teràpia amb agents immunomoduladors.

1.3.2.4.1 Antibiòtics profilàctics

L'estratègia més estudiada per a la prevenció de les SAIs i la SAP ha estat l'administració d'antibiòtics profilàctics. S'han dut a terme múltiples assajos clínics, sense resultats favorables que permetin l'ús d'aquesta estratègia a la pràctica clínica.

S'han realitzat diversos meta-anàlisis i revisions sistemàtiques per tal d'englobar els resultats de tots els estudis [69–71]. Tots aquests estudis difereixen en aspectes com els criteris d'inclusió, el temps d'administració de l'antibiòtic, el tipus d'antibiòtic, etc.

Els resultats d'aquests meta-anàlisis apunten a que no hi ha una reducció de la mortalitat dels pacients ni una millora del seu pronòstic funcional als 3 mesos en els pacients als que se'ls va administrar l'antibioteràpia preventiva. Sí que s'ha observat una reducció en el nombre d'infeccions totals, però no en el cas de la SAP.

Més concretament, en l'assaig PASS [72], en el que van administrar ceftriaxone 2g intravenosa una vegada al dia durant primers 4 dies al grup experimental de l'estudi, el qual té un total de 2538 pacients, van observar una disminució de les infeccions totals i de les UTIs, però no de la SAP ni de la mortalitat quan comparaven el grup tractat amb el grup no tractat. Un altre dels estudis amb una mida mostral més gran és l'STROKE-INF, un assaig clínic on van incloure 1217 pacients amb ictus. Al grup experimental, la pauta antibiòtica recomanada era amoxicil·lina o amoxicil·lina-clavulànic en combinació amb claritromicina o algun altre antibiòtic durant els 7 primers dies després de l'ictus. Els resultats van ser iguals que en l'estudi anterior i el que s'ha recollit als meta-anàlisis [73].

1.3.2.4.2 Immunomoduladors

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la SIIS contribueix en gran part a la susceptibilitat dels pacients a patir SAls. Per tant, s'han investigat diferents agents immunomoduladors d'algunes de les vies implicades en la SIIS com a possibles teràpies preventives de la SAP i les SAls en general. Aquestes teràpies podrien suposar una alternativa a l'antibioteràpia profilàctica, que com s'ha presentat en la secció 1.3.3.4.1, sembla no ser efectiva.

Un dels tractaments més estudiats és la inhibició del SNS mitjançant agents β -blocadors. A nivell experimental, el tractament de ratolins sotmesos MCAO amb aquest tipus de fàrmacs, com el propranolol ha aconseguit reduir les infeccions bacterianes als pulmons restablir alguns dels mecanismes afectats per la SIIS [25,26,33,74]. S'ha observat un efecte similar amb la inhibició de l'eix HPA [25,33].

No obstant, l'acció dels β -blocadors en la reducció de la SAP i les SAI s'ha explorat en diversos estudis amb diferents graus d'èxit. Per una banda, en un estudi retrospectiu s'ha reportat una reducció de la mortalitat i de la freqüència de SAP en aquells pacients amb ictus que es trobaven en teràpia amb β -blocadors [75]. Per contra, en un assaig clínic prospectiu, l'administració de β -blocadors després de l'ictus no va aconseguir reduir la incidència de SAP [76].

Altres estratègies immunomoduladores estudiades de manera experimental són la inhibició de CD147 [77], la inhibició de PTEN [78] i el tractament amb el factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [79]. Totes aquestes estratègies immunomoduladores que s'han estudiat tant de manera experimental com clínica estan resumides a la **taula 2**.

Mecanisme d'acció	Referència	Fàrmac	Temps de l'administració	Tipus d'estudi
Inhibició del SNS	Prass et al., 2003 [25]	Propranolol	Immediatament abans i també 4 i 8 hores després de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)
	Wong et al., 2011 [33]	Propranolol i 6-OHDA	24h després de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)
	Yan i Zhang, 2014 [26]	Propranolol	Immediatament abans i també 4 i 8 h després de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)
	Deng et al., 2016 [74]	6-OHDA	3 dies abans de l'oclusió	Experimental (rates MCAO)
	Sykora et al, 2015 [75]	BBs β 1 selectius, BBs no selectius	Abans i després de l'ictus	Clínic
	Maier et al., 2015 [76]	BBs (majoritàriament metoprolol i bisoprolol)	Abans i després de l'ictus	Clínic
	Maier et al., 2018 [80]	BBs	Abans i després de l'ictus	Clínic
Inhibició de l'eix HPA	Prass et al., 2003 [25]	RU486	24 h, 5 h, i immediatament abans de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)
Immunomodulació de les cèl·lules iNKT hepàtiques	Wong et al., 2011 [33]	α -GalCer	24 h després de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)
Inhibició de CD147	Jin et al., 2019 [77]	Anticòs CD147	24 h després de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)
Inhibició de PTEN	Guan et al., 2013 [78]	Bvp	24 h MCAO	Experimental (ratolins MCAO)
GM-CSF	Dames et al., 2018 [79]	mGM-CSF recombinant	6, 30 i 54 h després de l'oclusió	Experimental (ratolins MCAO)

Taula 2. Teràpies immunomoduladores per a la prevenció de la SAP i les SAI. Es representen en aquesta taula aquells estudis tant experimentals com clínics que han estudiat diferents tipus de tractaments que modulin el sistema immunitari per tal de prevenir l'aparició de les SAI i la SAP. Les abreviacions es poden trobar tant al text com a l'apartat d'abreviacions en els annexes d'aquesta tesi.

1.4 BIOMARCADORS EN L'ICTUS

Un biomarcador es pot definir com aquella característica mesurable de manera objectiva que permet ser utilitzada com a indicador d'un procés biològic, ja sigui normal, patològic o de resposta a una intervenció terapèutica [81]. Existeixen diferents tipus de biomarcadors, com poden ser els de neuroimatge o també els biomarcadors moleculars. Aquests últims, es poden mesurar en diferents tipus de mostra, com pot ser en sang, lisats cel·lulars, líquid cefalorraquidi, etc. En aquesta tesis ens centrarem en els biomarcadors moleculars, principalment els sanguinis.

En el marc de l'ictus, els biomarcadors poden cobrir varis aspectes de la patologia, com pot ser el diagnòstic, la diferenciació entre ictus isquèmic i hemorràgic, el pronòstic funcional del pacient, l'aparició de complicacions o la identificació de la seva etiologia.

Per tal que un bon biomarcador tingui una capacitat predictiva potencialment bona per a alguna d'aquestes indicacions ha de presentar una alta sensibilitat, és a dir, una elevada capacitat per detectar aquells individus que realment han desenvolupat la indicació, considerats els veritables positius, i també una alta especificitat, per tal de poder correctament aquelles persones que no han patit aquella indicació determinada (veritables negatius). Sovint, aquestes característiques no són fàcilment assumibles per a un sol indicador biològic. És per això que l'agrupació de dos o més biomarcadors en panells ha permès millorar lleugerament aquests aspectes tècnics i assolir en molts casos millors resultats que un biomarcador individual [82].

1.4.1 Biomarcadors per a les infeccions associades a l'ictus

Els biomarcadors en l'àmbit de les SAIs poden ser molt útils pel que fa a la seva predicció i prevenció. Poden servir com a complement als criteris clínics de diagnòstic, com a per tal d'estratificar els pacients que tinguin un alt risc de patir-les i també com a per a la monitorització en futurs assajos clínics. Per tot això, en els últims 10 anys s'han posat molts esforços en la recerca de nous biomarcadors predictors de les SAIs i la SAP.

Algunes de les molècules més estudiades són les relacionades amb la fase aguda dels processos inflamatoris, com són la proteïna C reactiva (CRP, *C-reactive protein*) [83] i la proteïna sèrum amiloide A (SAA, *serum amyloid A*) [84]. També s'han estudiat àmpliament la procalcitonina (PCT, *procalcitonin*) [85] i la copeptina [86], així com marcadors associats a l'eix HPA com MR-proADM [87].

Per altra banda, per l'alteració que trobem en els comptatges cel·lulars degut a la SIIS, aquests també han estat explorats com a biomarcadors, ja que són un fàcil d'obtenir en la rutina de la pràctica clínica, com per exemple el comptatge de glòbuls blancs (WBC, *white blood cell*) [86] o la ratio entre els comptatges de neutròfils i limfòcits (NLR, *neutrophil-to-lymphocyte ratio*) [88].

A més, l'alteració en els nivells de citocines i quimiocines que tenen aquests pacients ha portat a estudiar-les també com a biomarcadors predictors de SAI i SAP, com són la citocina antiinflamatòria IL-10 o les proinflamatòries IL-6 i IFN- γ [89–91].

La majoria d'aquestes molècules, i d'altres recollides en la revisió feta per Faura et al. [24], han resultat associades amb les SAIs i/o la SAP, així com predictors independents en models de regressió logística. Tot i així, cap d'aquests possibles biomarcadors han tingut un poder predictiu suficient com per ser traslladats a la pràctica clínica habitual.

Els motius pels quals aquests biomarcadors no han tingut prou valor en termes de reclassificació o discriminació són varis, com pot ser la variabilitat entre estudis, el que fa que hi hagi algunes discrepàncies entre ells i l'absència de *gold-standard*. Per altra banda, la finestra temporal en la que s'han estudiat els biomarcadors també és un factor clau, ja que normalment, les infeccions apareixen en els 2-3 primers dies després de l'ictus, i és important poder mesurar les molècules abans de l'aparició dels símptomes. A més, pocs dels estudis han avaluat el valor predictiu addicional dels biomarcadors.

1.4.2 Estratègies de descobriment de nous biomarcadors

La recerca de nous biomarcadors sanguinis està molt activa, degut a la necessitat clínica de disposar d'aquestes eines per al pronòstic i el diagnòstic de la SAP i les SAIs en general. Per tal d'identificar candidats encara no estudiats, s'acostuma a realitzar un procés de descobriment de nous biomarcadors amb, idealment, 4 fases ben caracteritzades representades a la **figura 4**. En aquestes fases, es va reduint el nombre de molècules estudiades mentre que s'incrementa la mida de les cohorts dels pacients amb les que comprovar l'eficàcia d'aquestes.

La primera fase, anomenada fase de descobriment, consisteix en realitzar tècniques de cribratge massiu sovint en sistemes model (*in vivo* o *in vitro*) o en mostres biològiques humanes per a realitzar una comparació binària entre mostres amb i sense presència del procés fisiopatològic estudiat. El cribratge massiu sol realitzar-se amb tecnologies d'alt rendiment, també conegudes com a tècniques *-òmiques*. Aquest cribratge es pot

realitzar a qualsevol dels quatre nivells moleculars bàsics: gens (genòmica), ARN (transcriptòmica), proteïnes (proteòmica) i metabòlits (metabolòmica).

Seguidament, en la fase de qualificació es corroboren els resultats observats durant la fase de descobriment per mitjà de l'ús de tècniques analítiques diferents a les anteriors, en molts casos dirigides específicament als candidats en estudi. En la fase de verificació s'augmenta de manera substancial la mida de la cohort (centenars de pacients), per tal de plasmar la variabilitat ambiental, genètica, biològica i estocàstica del conjunt de la població humana. Per últim, la fase de validació només es desenvolupa en un nombre reduït de candidats que han superat amb èxit la fase anterior. En aquesta fase s'avaluen els candidats per mitjà de tècniques optimitzades en grans cohorts (varis milers de pacients) que reflecteixin a la perfecció la variabilitat i heterogeneïtat del conjunt de la població [92].

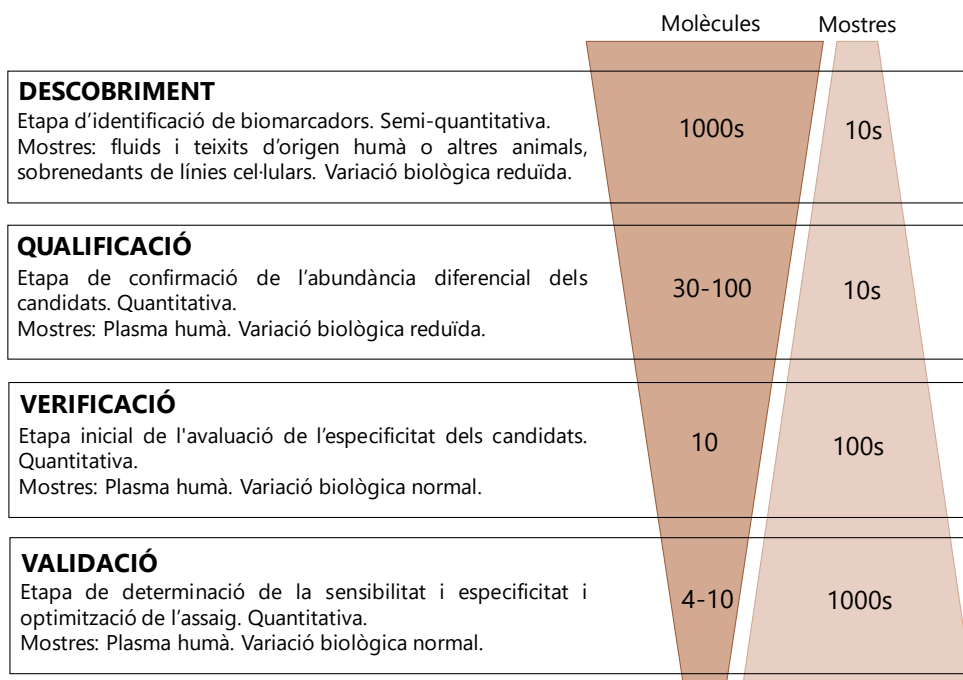


Figura 4. Procés de descobriment de nous biomarcadors. Molècules fa referència al número de candidats a ser avaluats en cada fase; Mostres fa referència al número de mostres en que s'avaluen aquests candidats. Adaptat de Rifai et al., (2006) [92].

1.4.2.1 Transcriptòmica

El transcriptoma és el conjunt complet de trànscrits provinents de gens o espècimens d'ARN transcrits en un tipus cel·lular, un teixit o un organisme sota una condició fisiològica o patològica. La tècnica que l'estudia de manera massiva és la transcriptòmica [93].

Els microarrays o tecnologies xip han esdevingut una de les eines principals que han permès una detecció simultània i no esbiaixada de gran diversitat de transcrits. Els microxips utilitzen sondes específiques dissenyades per a detectar, hibridar i permetre la quantificació de d'una gran part dels transcrits d'una mostra prèviament amplificada. Tot això és capaç de fer-ho sobre una única plataforma de mida de l'ordre dels micròmetres. Això fa que aquesta tècnica sigui fàcil, ràpida i econòmicament accessible.

A banda dels estudis de microarrays, les estratègies de seqüenciació d'ARN (RNA-seq, *RNA sequencing*) han estat les altres grans responsables de l'expansió que ha experimentat el camp de la transcriptòmica en els darrers anys. Aquestes noves tècniques tenen l'avantatge que permeten identificar nous transcrits que no hagin estat prèviament descrits, ja que no requereix cap sonda específica [94].

1.4.2.2 Proteòmica

L'estudi del conjunt de proteïnes d'un tipus cel·lular, teixit o organisme, anomenat proteoma, es realitza mitjançant tècniques de proteòmica.

L'espectrometria de masses (MS, *mass spectrometry*) és una de les tècniques més emprades dins del camp de la proteòmica, i la seva constant evolució ha permès un gran avenç en el sector. La identificació i quantificació de proteïnes per MS consisteix en una digestió enzimàtica prèvia per tal de fragmentar les proteïnes de la mostra en els seus respectius pèptids. Els pèptids resultants s'injecten paulatinament a l'espectròmetre de masses a través d'un cromatògraf líquid acoblat (LC-MS, *liquid chromatography MS*), que permet separar encara més els pèptids en funció de les seves característiques químiques (com pot ser mida dels pèptids, càrrega elèctrica o l'afinitat a la matriu del cromatògraf, entre d'altres). Finalment, els pèptids es detecten a l'espectròmetre en funció de la seva relació massa càrrega (m/z) [95].

Com a alternativa a la MS, han sorgit noves tècniques amb lligands específics per cada proteïna en concret, el que redueix els costos i el temps amb respecte a la MS, però per contra limita el descobriment de noves molècules.

Aquests lligands poden ser anticossos, formant panells o matrius que permeten detectar fins a centenars de proteïnes simultàniament en una mateixa mostra. Recentment, s'han desenvolupat també tècniques mixtes que utilitzen anticossos units a sondes de DNA que, per mitjà de l'amplificació d'aquestes, seqüències aconseguen una quantificació molt més acurada i sensible que els anticossos simples (per exemple, l'assaig d'extensió

per proximitat (PEA, *proximity extension assay*), d'Olink proteomics, www.olink.com) [96].

Una alternativa als anticossos com a lligands específics de les proteïnes són els aptàmers. Es tracta de petites cadenes senzilles d'àcid nucleic que per mitjà de la seva estructura tridimensional reconeixen i detecten proteïnes amb una alta afinitat i especificitat. Un exemple de l'ús d'aquesta tecnologia és l'assaig SOMAscan, de SomaLogic Inc [97].

2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta tesi doctoral són els següents:

1. Avaluar el poder predictiu de biomarcadors per a la SAP descrits en bibliografia prèvia en un estudi prospectiu.
2. Descobrir nous candidats a biomarcadors predictors per a la SAP en les 3 principals subpoblacions leucocitàries de pacients amb ictus i definir el rol d'aquestes en el desenvolupament de la malaltia.
3. Analitzar de manera retrospectiva biomarcadors prèviament mesurats a l'ingrés per a predicció de complicacions associades a l'ictus amb símptomes semblants com són les respiratòries i les cardíques.
4. Caracteritzar el dany pulmonar després de l'ictus mitjançant l'estudi proteòmic del BALF i del pulmó.

3. MATERIAL I MÈTODES

En aquesta secció, es detallen els materials i mètodes emprats per a la realització d'aquesta tesi. Es troba estructurada en diferents apartats, corresponents a la metodologia utilitzada per al compliment de cadascun dels objectius. Aquesta estructura també se segueix a la secció Resultats, on trobem un capítol en el que es detallen els resultats obtinguts per a cada objectiu, així com a la Discussió.

3.1 ESTUDIS CLÍNICS

3.1.1 Estudi clínic 1

3.1.1.1 Disseny experimental

Es tracta d'un estudi multicèntric prospectiu, en el que s'han mesurat biomarcadors descoberts prèviament en la literatura o per resultats propis del grup, per avaluar-ne la seu paper com a predictors de la SAP. El reclutament de l'estudi va començar al juliol de 2018 i es va estendre fins al juny de 2021. El reclutament va ser interromput des del 15 de març al 15 de juny de 2020 per la pandèmia COVID19. El càlcul mostral inicial era de 430, però finalment s'han pogut reclutar 340 pacients, degut en part a la pandèmia. En primer lloc, es va realitzar un anàlisi *interim* en 38 pacients amb tots els biomarcadors seleccionats, i aquells més prometedors es van mesurar a tota la cohort sencera. Per aquest *interim*, els pacients es van aparellar per sexe, edat, NIHSS i disfàgia, seleccionant 12 pacients amb SAP, 4 pacients amb altres infeccions i 22 pacients sense cap infecció. Els candidats més interessants s'han mesurat en tots els pacients de l'estudi.

3.1.1.2 Participants de l'estudi

En aquest estudi, han participat 8 centres del territori espanyol: Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Hospital del Mar, Hospital Universitario Cruces, Hospital General Universitario de Albacete, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Hospital Universitario Virgen del Rocío i Hospital Universitario de Jaén. Tots els estudis humans han estat aprovats pels Comitès d'Ètica de cada centre, i s'ha obtingut un consentiment informat de tots els pacients o familiars propers, d'acord amb la Declaració de Helsinki (1964) i les seves actualitzacions.

Els criteris d'inclusió per aquest estudi van ser l'aparició d'un ictus dins les 24 hores prèvies a la inclusió, amb un NIHSS \geq 4, el consentiment informat del pacient i una previsió d'estada a l'hospital de \geq 7 dies. Els criteris d'exclusió que es van establir van ser: infecció aguda o crònica, antibiòtics administrats en els 15 dies previs a l'episodi isquèmic,

malalties cròniques inflammatòries, neoplàsies actives, no possibilitat a seguiment o rebuig a participar. En la segona part de l'estudi, un test PCR negatiu per SARS-CoV-2 a l'ingrés va ser requerit per a la inclusió. Els diagnòstics clínics de infecció se recollien diàriament segon criteri dels metges tractants. Paral·lelament, els investigadors de l'estudi recollien diàriament la informació necessària per avaluar el compliment dels criteris CDC modificats. La SAP es va diagnosticar d'acord amb els criteris CDC modificats [98].

El protocol de l'estudi va consistir en l'extracció de sang seriada de dues mostres: una en el moment de la inclusió del pacient (que anomenarem T1; en les primeres 24 hores després de l'ictus) i una altra entre les 24 i les 48 hores després de l'ictus (que anomenarem T2). En cas de sospita d'infecció, es realitzava un hemograma, una radiografia de tòrax, una sediment/urocultiu i un hemocultiu.

3.1.1.3 Recollida de sang

Les mostres sanguínies van ser extretes en dos temps diferents, tal i com s'ha comentat en el paràgraf anterior. En cada extracció, es van utilitzar tubs SST per a l'obtenció sèrum i tubs EDTA per a l'obtenció del plasma. Els tubs es van centrifugar a 1500g i a 4°C durant 15 minuts. Les alíquotes de plasma resultants es van emmagatzemar a -80°C fins a la mesura dels biomarcadors.

3.1.1.4 Mesura de biomarcadors

Per a l'anàlisi *interim*, es van mesurar en 36 pacients 7 biomarcadors diferents estudiats prèviament com a predictors de la SAP en la literatura existent. A la taula 4 es representen els biomarcadors triats, juntament amb el tipus de mesura feta i la casa comercial corresponent.

	Publicació	Tècnica emprada	Casa comercial
CRP	[83]	Nefelometria	Siemens
SAA	[84]	ELISA	HyCult
MR-proADM	[87]	TRACE	ThermoFisher
suPAR	[87]	ELISA	R&D
Copeptin	[86]	TRACE	ThermoFisher
Vitamin D-25OH	[99]	CLIA	DiaSorin

Taula 4. Biomarcadors analitzats en l'anàlisi *interim*. A la primera columna podem trobar les publicacions en les quals s'ha estudiat el biomarcador com a predictor de la SAP, i les altres dues columnes es refereixen a la tècnica i a la casa comercial que s'han emprat per a la mesura del biomarcador. ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, TRACE: *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*, CLIA: *Chemiluminescent immunoassay Technology*, MR-proADM: *mid regional pro-adrenomedullin*, suPAR *soluble urokinase-type plasminogen activator receptor*. La resta d'abreviacions s'han mencionat prèviament i es troben al l'inici de la tesi.

Posteriorment, per a l'anàlisi de tota la cohort sencera es van seleccionar CRP, SAA i MR-proADM basant-nos en els resultats obtinguts en l'anàlisi *interim*.

La mesura de CRP, MR-proADM, Copeptin i VitaminD-25OH es va realitzar al servei de Bioquímica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, seguint les instruccions del fabricant i determinant la concentració de cada mostra per simple.

Respecte les molècules mesurades per ELISA, es van seguir les instruccions donades pel fabricant. La densitat òptica de cada mostra es va mesurar amb un lector de microplaques Synergy™ Mx (BioTek Instruments Inc., USA). Les mostres es van analitzar per duplicat, i els replicats amb un coeficient de variació de més del 20% van ser eliminats de l'anàlisi estadístic.

3.1.1.5 Anàlisis estadístics

Per als anàlisis estadístics, es van utilitzar tant el software R (versió 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria) com l'Statistical Packages for Social Sciences (version 22; SPSS Inc.; USA) i el GraphPad Prism per a la construcció de gràfics (versió 6; GraphPad Software; USA).

Per a l'avaluació de la normalitat de les variables contínues, es van emprar tant gràfics de tipus histograma com el test de Kolmogorov-Smirnov. Per als anàlisis univariants, es va emprar el test T d'Student en cas de normalitat de la variable contínua, i el test de Mann-Whitney en cas de distribució no normal. La comparació de variables categòriques es va realitzar mitjançant el χ^2 , i les correlacions entre variables contínues es van estudiar amb la Rho d'Spearman.

Es van construir models de regressió logística binària per els dos temps de mida dels biomarcadors (T1 i T2). En aquests models es van incloure variables confusores d'acord amb la literatura existent, tenint en compte les covariants disponibles des del punt de vista clínic en el moment d'avaluació del model. La multicol·linealitat entre les variables predictorres es va comprovar amb el Factor d'Inflació de la Variància. Es van construir models clínics i posteriorment a aquests se'ls van afegir els biomarcadors a avaluar. A l'introduir les variables CRP i SAA en els dos temps en continu en els models, es van transformar logarítmicament amb el logaritme neperià per tal de pal·liar la seva distribució esbiaixada.

Per a la selecció dels panells, la millor combinació de biomarcadors es va seleccionar amb el software PanelomiX [109], optimitzant la combinació per a la màxima capacitat predictiva, amb un màxim de 3 biomarcadors. De manera resumida, aquest software

utilitza una mètode de combinació iterativa de biomarcadors i llindars per a seleccionar els punts de tall de cada biomarcador que aporten una millor classificació, i posteriorment estudia la robustesa del panell mitjançant corbes ROC (*Receiver Operating Characteristic*) i validacions creuades (CV, *cross-validation*).

Per tal d'avaluar el valor predictiu addicional de les combinacions seleccionades als models de regressió logística amb els predictors clínics, el mètode de De Long es va utilitzar per comparar les àrees sota la corba (AUC, *area under the curve*) de les corbes ROC.

En tots els test, la significació estadística es va considerar quan el p-valor era menor a 0.05.

3.1.2 Estudi clínic 2

3.1.2.1 Disseny experimental

Aquest estudi es divideix en dues fases: descobriment i qualificació. En les dues fases, es va analitzar ARN i proteïna de 3 subpoblacions leucocitàries (limfòcits, monòcits i neutròfils). Es van incloure 12 pacients per a la fase de descobriment, mentre que per a la fase de qualificació es van incloure 22 pacients. La mida mostral es va seleccionar segons disponibilitat de les mostres.

3.1.2.2 Participants de l'estudi

Els participants van ser reclutats en dos centres diferents: l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona) i l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona). Tots els estudis humans han estat aprovats pels Comitès d'Ètica de cada centre, i s'ha obtingut un consentiment informat de tots els pacients o familiars propers, d'acord amb la Declaració de Helsinki (1964) i les seves actualitzacions.

Es van incloure pacients amb un ictus isquèmic en les 24 hores anteriors a la inclusió. A més, els participants havien de tenir un NIHSS \geq 10. Els criteris d'exclusió que es van establir van ser: infecció aguda o crònica, antibiòtics administrats en els 15 dies previs a l'episodi isquèmic, malalties cròniques inflamatòries, neoplàsies actives, no possibilitat a seguiment o rebuig a participar. La SAP es va diagnosticar d'acord amb els criteris CDC modificats [98].

3.1.2.3 Recollida de sang

Les mostres sanguínies van ser extretes entre les 24 i les 48 hores després de l'episodi isquèmic. La sang va ser recollida en tubs EDTA per a la separació leucocitària, i en tubs

Blood ARN Tubes (ThermoFisher Scientific, USA) per a l'extracció de ARN total de sang complerta.

3.1.2.3 Separació leucocitària

Tres subpoblacions leucocitàries (limfòcits – CD3+, monòcits – CD14+ i neutròfils – CD16+) van ser aïllades a partir de sang total per separació cel·lular magnètica (MACS, *magnetic cell sorting*). A partir de la sang recollida en tubs EDTA, es va crear un gradient de densitat (Histopaque 1077 i Histopaque 1119, Sigma-Aldrich, USA) per aïllar cèl·lules polimorfonuclears (PMN, *polymorfonuclear cells*) i cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*). Un cop aïllades es van realitzar una sèrie de rentats amb tampó fosfat salí (PBS, *phosphate buffered saline*) i amb buffer de lisi d'eritròcits (Miltenyi, Alemanya). L'equip AutoMACS Pro Separator (Miltenyi) va ser utilitzat per a la separació magnètica. A partir de les PBMCs, es van aïllar per selecció positiva les cèl·lules CD14+, marcant les cèl·lules amb CD14 Microbeads per humans (Miltenyi), també les cèl·lules CD3+, en aquest cas amb les CD3 MicroBeads per humans (Miltenyi). Els neutròfils van ser aïllats també per selecció positiva a partir de les PMNs utilitzant CD16 Microbeads per humans (Miltenyi).

Un cop es van aïllar les subpoblacions leucocitàries i després de dos rentats amb PBS, les cèl·lules es van comptar amb el comptador Coulter (Beckmann Coulter, Inc, USA) i es van dividir en dues meitats. Després d'una centrifugació de 10 minuts a 4°C i a 300g, els sobrenedants es van descartar i els pellets es van emmagatzemar a -80°C fins a l'extracció de ARN i proteïna.

3.1.2.4 Extracció d'ARN i proteïna

L'ARN de les subpoblacions leucocitàries aïllades es va extreure utilitzant el SPEEDTOOLS Total RNA Extration kit (Biotools, Spain), i l'ARN dels tubs Tempus™ Blood RNA va ser extret amb el Maxwell® 16 miARN Tissue Kit (Promega, USA). Ambdós es van utilitzar seguint les instruccions del fabricant. Les concentracions d'ARN de totes les mostres van ser quantificades amb l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (ThermoFisher), i la qualitat de l'ARN aïllat va ser estudiat utilitzant el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA).

Per a l'extracció de proteïna, es va utilitzar un tampó de lisi d'Urea amb els següents components: 20 mM Hepes (Gibco, ThermoFisher Scientific), 9M Urea (Sigma-Aldrich), 1mM Na₃VO₄, 2.5 mM Sodium pyrophosphate, 1mM *Phosphatase Inhibitor Cocktail 3* (Sigma-Aldrich), PMSF (Sigma-Aldrich) i Apronitin de pulmó boví (Sigma-Aldrich). Les

cèl·lules es van lisar amb el sonicador LabsonicM (Sartorius, Alemanya), i després d'una centrifugació (20000g, 15 minuts, 4°C), els pellets es van descartar i la proteïna dels sobrenedants es va quantificar utilitzant el mètode Bradford (explicat a l'apartat 3.1.4).

3.1.2.5 Fase de descobriment

La fase de descobriment d'aquest estudi va ser duta a terme en ARN i proteïna de 12 pacients amb ictus, 6 dels quals van desenvolupar SAP i els 6 restants no van desenvolupar cap tipus d'infecció. Els pacients van ser aparellats per sexe, edat i NIHSS. A més a més, per l'anàlisi de transcriptòmica, l'ARN total de sang completa també va ser estudiat.

3.1.2.5.1 Transcriptòmica

L'anàlisi de microarrays es va realitzar a la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) al Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Per aquest experiment, es van utilitzar la plataforma de microarrays Affymetrix GeneTitan i el Genechip Human Clariom S 96x arrays plate (ThermoFisher - Affymetrix, UK). Aquesta matriu analitza els patrons d'expressió gènica a nivell de genoma complet en una única matriu amb sondes que cobreixen el genoma diana i permeten un resum acurat de l'expressió a nivell gènic.

Es va partir de 10 ng totals d'ARN de cada mostra. L'ADN sentit de cadena simple adequat per al marcatge va ser generat a partir de ARN total amb el GeneChip Pico Reagent Kit from Affymetrix (ThermoFisher - Affymetrix) seguint les instruccions del fabricant. L'ADN sentit de cadena simple es va fragmentar, marcar i hibridar a la matriu amb el GeneChip Pico Terminal Labeling and Hybridization Kit, del mateix fabricant. Les plaques van ser escanejades per obtenir els arxius .cel, i un primer control de la qualitat tècnica es va realitzar amb el software Expression Contol.

3.1.2.5.2 Proteòmica

L'estudi de proteòmica va ser dut a terme pel Grup de Proteòmica del Vall d'Hebron Institut d'Oncologia (VHIO).

2 ug de proteïna total de cada mostra van ser carregats en un gel de poliàcrilamida-SDS al 12% sota condicions reductores, i posteriorment va ser tenyit amb Coomassie col·loïdal 6250 (Bio-Rad, USA). El gel es va retallar per cada carril, i es va realitzar una digestió de les proteïnes, amb una posterior reducció i tripsinització. Els pèptids digerits van ser analitzats mitjançant LC-MS en un espectròmetre de masses Orbitrap Velos (ThermoFisher) en trampa iònica lineal. El software Progenesis® QI for proteomics (versió 3.0, Nonlinear dynamics, UK) es va utilitzar per a l'anàlisi de les dades obtingudes

en la MS. Finalment, la identificació proteica de los candidats es va dur a terme mitjançant el software Mascot (Matrix Science, UK). Una descripció detallada del procediment ha estat exposat prèviament [100].

3.1.2.5.3 Anàlisi bioinformàtic

Per a l'anàlisi bioinformàtic de les dades, realitzat amb el software R (versió 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria), les dades de cadascun dels tipus de mostres s'han analitzat de manera independent.

Respecte a l'anàlisi de dades de transcriptòmica, per a la càrrega dels arxius .cel es va utilitzar el paquet d'R *oligo*. Es va realitzar un control de qualitat de les dades mitjançant el paquet *arrayQualityMetrics* [101], un anàlisi de components principals (PCA, principal component analysis) i un boxplot de les intensitats de cadascun dels arxius.

Després del control de qualitat, es va emprar l'algoritme Robust Multiarray Average [102] per al pre-processament de les dades per tal d'ajustar el *background* i normalitzar els valors d'expressió de les sondes. Posteriorment es va realitzar un filtrat no específic d'aquells gens que estaven per sota del percentil 75 pel que fa a la SD.

La selecció dels gens diferencialment expressats es va dur a terme mitjançant models lineals amb modificacions de Bayes per a l'estimació de la variància [103], amb el paquet *limma*. La correcció per comparacions múltiples es va calcular amb el *False Discovery Ratio* (FDR) [104], i el *fold-change* logarítmic (logFC), ha estat calculat dividint l'expressió mitja dels valors del grup de pacients amb SAP vs el grup de pacients sense SAP.

Les dades de proteòmica s'han obtingut a partir dels valors d'abundància de les proteïnes. En primer lloc, s'ha realitzat un filtratge en el que s'han seleccionat aquelles proteïnes amb més d'un pèptid únic identificat.

Els valors d'abundància s'han transformat logarítmicament amb un logaritme de base 10, i posteriorment s'han centrat per la mitjana de cada mostra. El control de qualitat s'ha realitzat de la mateixa manera que en el cas de les dades de transcriptòmica. La selecció dels gens diferencialment expressats s'ha realitzar mitjançant models lineals amb modificacions de Bayes per a l'estimació de la variància (33), amb el paquet *limma*.

3.1.2.6 Fase de qualificació

Per a la fase de qualificació, es van seleccionar 22 pacients, 11 d'aquests van desenvolupar SAP i els 11 restants no van desenvolupar cap tipus d'infecció després de

l'ictus. Els pacients van ser aparellats per sexe, edat i NIHSS. Aquesta mida mostral es va decidir d'acord amb la disponibilitat de les mostres.

En aquesta fase, es van seleccionar candidats de la fase de descobriment, d'acord amb la seva significació estadística i també per bibliografia prèvia de les molècules seleccionades, i es van avaluar en la subpoblació leucocitària corresponent.

3.1.2.6.1 RT-qPCR

Per a la qualificació dels gens candidats escollits de l'anàlisi transcriptòmic de la fase de descobriment, es va realitzar una reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) i una posterior PCR quantitativa (qPCR, *quantitative PCR*). D'aquesta manera, es va poder estudiar de manera quantitativa l'expressió gènica dels candidats seleccionats. A banda dels gens escollits, també es van analitzar 3 gens específics de cadascuna de les subpoblacions leucocitàries estudiades per tal d'assegurar-ne la seva puresa (*ASGR2* per als monòcits, *THEMIS* per als limfòcits i *AZU1* per als neutròfils).

Per a la RT-PCR, a partir d'ARN s'ha sintetitzat ADN complementari de cadena simple amb el kit Superscript IV Vilo Master Mix (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Posteriorment, la qPCR es va realitzar utilitzant targetes microfluídiques TaqMan™ Low Density Array (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) personalitzades. Les sondes utilitzades per a cada gen estan representades a la **taula 3**. Cada reacció es va dur a terme per triplicat en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), i es van analitzar amb el software SDS v2.4 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific).

Per a cada mostra, es va realitzar la mitja del Ct dels triplicats, incloent aquells amb un error estàndard menor al 30%, i posteriorment es van normalitzar per la mitjana geomètrica dels controls endògens. Amb aquests valors, la quantificació relativa es van calcular amb l'equació de Livak: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gen	Sonda	Tipus
<i>S100A8</i>	Hs00374264_g1	Candidat
<i>S100A12</i>	Hs00942835_g1	Candidat
<i>VCAN</i>	Hs00171642_m1	Candidat
<i>GCA</i>	Hs01031542_m1	Candidat
<i>ADM</i>	Hs00969450_g1	Candidat
<i>RETN</i>	Hs00220767_m1	Candidat
<i>TMEM144</i>	Hs00938021_m1	Candidat
<i>CP</i>	Hs00236810_m1	Candidat
<i>MYH10</i>	Hs00992055_m1	Candidat
<i>GADD45A</i>	Hs00169255_m1	Candidat
<i>PDZK1IP1</i>	Hs00173779_m1	Candidat
<i>IFT52</i>	Hs00941057_m1	Candidat
<i>ASGR2</i>	Hs00154160_m1	Marcador de monòcits
<i>THEMIS</i>	Hs01041269_m1	Marcador de limfòcits
<i>AZU1</i>	Hs00156049_m1	Marcador de neutròfils
<i>B2M</i>	Hs00187842_m1	Control endogen
<i>PPIA</i>	Hs04194521_s1	Control endogen
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	Control endogen

Taula 3. Sondes TaqMan™ emprades per a l'anàlisi d'expressió gènica per qPCR.

3.1.2.6.2 Western Blot

La determinació de l'expressió de proteïnes es va dur a terme mitjançant la tècnica de Western Blot. Es van analitzar concentracions iguals de proteïna de llisats cel·lulars (10µg) mitjançant electroforesi SDS-PAGE al 10% en condicions reductores, y es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa utilitzant el sistema de transferència Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, USA). La presència de proteïnes a la membrana es va visualitzar amb la tinció del Vermell Ponceau i posteriorment es va procedir al bloqueig de les membranes durant 1 hora amb llet desnatada al 10% en PBS-tween (PBST).

Posteriorment, les membranes es van incubar amb els anticossos primaris específics durant tota la nit a 4°C. Després de 3 rentats de 3 minuts amb PBST, les membranes es van incubar amb els anticossos secundaris corresponents conjugats amb HRO durant 1 hora a temperatura ambient.

Finalment, les bandes de proteïnes es van visualitzar per quimioluminescència utilitzant el kit Pierce ECL Western Blotting Lumino /Enhancer y Stable Peroxidase (Thermo Fisher) i l'aparell Odyssey Fc (LI-COR Biosciences, USA). El software Image J s'ha emprat per quantificar la quantitat de proteïna mesurant la intensitat de les bandes. Es

va utilitzar la intensitat de senyal adquirida amb el Vermell Ponceau com a control de càrrega. Els anticossos primaris emprats són antiPGRP-S de ratolí (concentració 2µg/ml, Invitrogen), antiVCP de conill (dilució 1:1000, Cell Signaling Technology, USA) i anti-YKL-40 (concentració 1µg/ml, Abcam, UK). Els anticossos secundaris

3.1.2.6.3 Anàlisis estadístics

Per als anàlisis estadístics, es van utilitzar tant el software R (versió 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing; Austria) com l'Statistical Packages for Social Sciences (version 22; SPSS Inc.; USA) i el GraphPad Prism per a la construcció de gràfics (versió 6; GraphPad Software; USA).

La normalitat es va estudiar tant gràficament com emprant el test de Shapiro-Wilk (degut a que la N era menor a 30). Si les variables seguien una distribució normal, es va utilitzar el test T d'Student per a l'anàlisi univariant, i la prova U de Mann-Whitney com a alternativa no paramètrica.

En tots els test, la significació estadística es va considerar quan el p-valor era menor a 0.05.

3.1.3 Estudi clínic 3

3.1.3.1 Participants de l'estudi

L'estudi Stroke-Chip va ser un estudi observacional, prospectiu i multicèntric dut a terme als departaments d'urgències i unitats d'ictus de 6 hospitals catalans (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospital Universitari Josep Trueta, Hospital Universitari Joan XXII i Hospital Verge de la Cinta) [108].

Els pacients van ser inclosos a l'arribada a l'hospital. Els criteris d'inclusió van ser pacients majors de 18 anys; sospita d'ictus en la primera avaluació mèdica i persistència dels símptomes a l'arribada a urgències; temps entre el començament dels símptomes i la recollida de sang menor a 6 hores; recollida de sang prèvia al tractament trombolític; i signatura del consentiment informat. L'únic criteri d'exclusió era la impossibilitat de recollir sang en el marc temporal triat.

Per aquesta tesi, s'ha realitzat un anàlisi retrospectiu dels pacients amb ictus isquèmic d'aquesta cohort de pacients. Neuròlegs certificats van avaluar de manera retrospectiva histories clíniques per tal de registrar les complicacions post-ictus d'aquests pacients durant l'hospitalització. Per aquest estudi, s'han analitzat de manera independent la

insuficiència cardíaca aguda descompensada (ADHF, *acute decompensated heart failure*) i les infeccions de tracte respiratori (RTI, *respiratory tract infection*)

3.1.3.2 Diagnòstic de complicacions després de l'ictus

La ADHF va ser diagnosticada, seguint les guies de l'American Heart Association [109], com la nova aparició de dispnea i/o fatiga, juntament amb retenció de líquids, que pot causar congestió pulmonar o esplènica, o edema perifèric. Tot això en absència d'altres causes de la dispnea.

Les RTIs es van diagnosticar d'acord amb els criteris CDC [55], ja que al moment de la revisió d'històries clíniques els criteris CDC modificats no hi havien sigut descrits encara. Breument, el diagnòstic de una RTI requereix la presència de febre (temperatura corporal $>37.5^{\circ}\text{C}$) o comptatge de les WBC elevat ($>1.2 \times 10^{10}/\text{L}$); i evidència d'implicació específica d'òrgan (esput purulent, infiltració pulmonar, tos, etc) o un cultiu sanguini positiu. Les RTI van ser classificades com a RTI de vies respiratòries altes, RTI de vies respiratòries baixes i pneumònia. A diferència dels criteris CDC modificats descrits a la Introducció, el diagnòstic de pneumònia segons criteris CDC requereix confirmació radiològica. Per aquesta raó, l'*endpoint* avaluat en aquest estudi va ser RTI enlloc de pneumònia.

3.1.3.3 Recollida de sang i mesura de biomarcadors

Les mostres sanguínies van ser extretes a l'ingrés dels pacients, dins de les 6 primeres hores després de l'aparició dels símptomes de l'ictus, i abans de l'administració de teràpies de reperfusió. La sang va ser recollida en tubs EDTA, centrifugada a 1500g i a 4°C durant 15 minuts. Les alíquotes de plasma resultants es van emmagatzemar a -80°C fins a la mesura dels biomarcadors.

Es van mesurar 14 biomarcadors per immunoassaig. Aquests 14 biomarcadors van ser seleccionats a partir de resultats previs i bibliografia, tal i com es reporta a l'article original de l'estudi [108], per a la diferenciació entre ictus isquèmic, hemorràgic i mímic. Posteriorment, es van analitzar de manera retrospectiva per al diagnòstic de les complicacions associades a l'ictus. Les proteïnes analitzades són les següents proteïnes: *insulin-like growth factor-binding protein-3* (IGFBP3), *tumor necrosis factor receptor-1* (TNFR1), *growth-related oncogene- α* (GROA), *Fas ligand* (FasL), *heat shock 70 kDa protein-8* (Hsp70), *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide* (NT-proBNP), *d-dimer* (DDi), IL-6, *von Willebrand factor* (vWF), *vascular adhesion protein-1* (VAP-1),

endostatin, *S100 calcium-binding protein B* (S100B), *apolipoprotein CIII* (APOCIII) i *neuron cell adhesion molecule* (NCAM).

Els valors dels biomarcadors van ser transformats en logaritme de base 10, i dividits pel valor de la mostra control de cada placa. Degut a la alta variabilitat intra-assaig en algunes molècules, tots els valors van ser estandarditzats utilitzant el Z-score.

3.1.3.4 Anàlisis estadístics

Per als anàlisis estadístics, es van utilitzar tant el software R (versió 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing; Austria) com l'Statistical Packages for Social Sciences (version 22; SPSS Inc.; USA) i el GraphPad Prism per a la construcció de gràfics (versió 6; GraphPad Software; USA).

Degut a que la mida mostral era molt gran ($n > 500$), es va assumir una distribució normal d'acord amb el teorema central del límit. Per als anàlisis univariants, es va emprar el test T d'Student. Per a comparar dues variables categòriques, el test emprat va ser el X^2 . Les variables normals es representen com a mitjana (\pm desviació estàndars (SD, *standard deviation*)).

Es van construir models de regressió logística binària. En aquests models es van incloure variables confusores d'acord amb la literatura existent. La multicol·linealitat entre les variables predictores es va comprovar amb el Factor d'Inflació de la Variància. Per a l'ADHF, es va aplicar la correcció de Firth (amb el paquet *logistf*) a l'hora de construir els models per a minimitzar la sobreestimació dels coeficients, degut a la baixa taxa d'esdeveniments.

La millor combinació de biomarcadors per a la predicció de les dues complicacions abans mencionades es va seleccionar amb el software PanelomiX [109], d'igual manera al comentat a l'apartat 3.1.1.5.

Per tal d'avaluar el valor predictiu addicional de les combinacions seleccionades als models de regressió logística amb els predictors clínics, el mètode de De Long es va utilitzar per comparar les AUCs de les corbes ROC. A més, es va realitzar una validació interna dels models de regressió logística construïts mitjançant una CV de 10 iteracions (10-fold) amb 3 repeticions.

En tots els test, la significació estadística es va considerar quan el p-valor era menor a 0.05.

3.2 ESTUDI EXPERIMENTAL

3.2.1 Disseny experimental

Tots els procediments quirúrgics han estat duts a terme en concordança amb la legislació espanyola i seguint les directives de la Unió Europea, a més de ser aprovats pel comitè d'Ètica del Vall d'Hebron Institut de Recerca (protocol 03/19).

A més, tots els experiments s'han realitzat seguint les pautes ARRIVE i de manera aleatòria [110]. S'han utilitzat ratolins mascles de la soca C57BL/6J, de 8-12 setmanes d'edat (Janvier Labs, França). Els animals s'han mantingut en un ambient climàticament controlat amb cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor amb llum i aigua *ad libitum*. Per tal de minimitzar el dolor i el malestar dels animals, s'ha administrat analgèsia (Buprenorphine, 0.05 mg/kg, s.c, Divasa Farma-Vic S.A, Espanya) i anestèsia (isofluorà, 5% per inducció, 2% per manteniment amb aire medicinal, Abbot Laboratories, Espanya) durant els procediments quirúrgics.

Un total de 65 animals van ser utilitzats per a completar l'estudi. En 53 animals (49 ratolins isquèemics i 14 ratolins *sham*), s'ha avaluat el dany pulmonar i s'ha caracteritzat el perfil d'expressió proteica en el BALF d'aquests animals. En un subgrup d'aquests animals, format per 24 ratolins isquèemics i 6 ratolins *sham*, s'ha caracteritzat també l'expressió proteica dels homogenats de pulmó. Per altra banda, per a l'avaluació de la permeabilitat pulmonar, es van utilitzar 7 ratolins MCAO i 5 ratolins *sham* diferents dels utilitzats prèviament. La mida mostral s'ha triat en funció de la disponibilitat de les mostres i dels animals.

3.2.2 Cirurgia MCAO

L'infart transitori de l'arteria cerebral mitja (MCA, *middle cerebral artery*) va ser induït per mitjà de la introducció d'un filament intraluminal, com s'ha descrit prèviament [111]. Breument, els animals van ser anestesiats, mantenint la temperatura corporal de l'animal a 37°C amb un coixinet tèrmic. El flux sanguini cerebral (CBF, *cerebral blood flow*) regional va ser monitoritzar prop de la regió irrigada per la MCA fixant una sonda del làser Doppler al crani. Posteriorment, els animals van ser col·locats en posició supina i després de l'exposició quirúrgica de la bifurcació dreta de les artèries caròtides externa i interna, un monofilament de *nylon* recobert de silicona (Docol Corporation, USA) va ser introduït per la caròtida externa per tal d'ocloure la MCA (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*). Aquesta oclusió es va confirmar per una reducció en el CBF registrada per la sonda del làser Doppler.

Després de l'oclusió, es va deixar als animals que es recuperessin de l'anestèsia. 90 minuts més tard, els ratolins van ser re-anestesiats per a poder retirar el filament i induir a la reperfusió. Només aquells animals amb una reducció del CBF del 80% després de la introducció del filament i una recuperació del 75% després de la retirada han estat inclosos a l'estudi. Després de la reperfusió, es va deixar als animals que es recuperessin i van ser sacrificats 24 hores després de la cirurgia.

Per a la cirurgia *sham*, es va realitzar el mateix procediment quirúrgic sense la inserció del filament de *nylon*.

3.2.3 Col·lecció de teixits i quantificació del volum d'infart

Els animals van ser anestesiats 24 hores després de la cirurgia, recollint sang en tubs eppendorf per punció cardíaca. A més, els pulmons van ser rentats 5 vegades a través de la tràquea amb 500 µl de solució salina, obtenint aproximadament 300 µl de BALF [112]. A continuació, els ratolins van ser perfosos transcardíacament amb solució salina freda per tal d'extreure la sang dels vasos cerebrals, i els pulmons i el cervell van ser recollits.

Immediatament després de la perfusió salina, el cervell va ser extret i tallat en 6 seccions coronals seriades d'1 mm. Aquestes seccions van ser tenyides amb 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich) per tal de mesurar el volum d'infart, tal i com s'ha descrit prèviament [113]. Les imatges del TTC van ser capturades amb un escàner CanoScan 4200F (Canon, Japó) i quantificades amb el software Image J. Els volums d'infart van ser calculats tal i com s'ha descrit prèviament [114]. Després de la captura de les imatges de la tinció TTC, els hemisferis ipsilaterals (IP) i contralaterals (CL) van ser separats i congelats a -80°C.

Els tubs amb la sang es van centrifugar a 1500 g a 4°C durant 15 minuts, i la capa superior corresponent al sèrum va ser recollida i congelada a -80°C. Les mostres de BALF van ser centrifugades a 12000 rpm a 4°C i el sobrenedant va ser recollit i congelat a -80°C.

3.2.4 Quantificació de la concentració de proteïna en BALF

Per a la quantificació de la concentració de proteïna al sobrenedant del BALF, es va utilitzar el mètode Bradford [115]. En primer lloc, es van afegir els següents inhibidors de proteases i fosfatases a les mostres de BALF: 1% PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich), 0.5% Aprotinin (de pulmó boví, Sigma-Aldrich), i 0.5% Phosphatase inhibitor cocktail-3 (Sigma-Aldrich). Posteriorment, el reactiu Coomassie Protein Assay

Reagent (ThermoFisher Scientific) va ser utilitzat per a la quantificació. L'absorbància va ser mesurada a 595 nm per un lector de plaques Synergy™ Mx microplate reader (Biotek Instruments).

Totes les mostres van ser mesurades per duplicat, i aquelles amb un coeficient de variació major del 20% van ser repetides per assegurar la quantificació acurada de la concentració de proteïna d'aquella mostra. A més, un control interplaca va ser utilitzat per tal d'estudiar la variabilitat intra-assaig.

3.2.5 Avaluació de la permeabilitat pulmonar

Per tal d'estudiar la permeabilitat pulmonar, es va injectar de manera intravenosa als animals fluoresceïn isothiocyanate (FITC)-dextrà, 4 kDa (Sigma), a una dosi de 20 mg/kg. La injecció es va realitzar 30 minuts abans del sacrifici. Es va injectar un volum de 100 µl de manera retroorbital a una concentració de 5mg/ml.

Per a l'avaluació de la permeabilitat, es va calcular la ratio entre la fluorescència del BALF i la del sèrum. La fluorescència es va llegir amb un lector de plaques SynergyMx (Biotek Instruments), amb una longitud d'ona de 492 nm per a l'excitació dels fluorofòrns i una de 515 nm per a detectar l'emissió d'aquests. A més, la quantitat de FITC-dextrà retinguda al pulmó també es va mesurar. Els pulmons drets van ser submergits en formamide (ThermoFisher) a 37 °C. Després de 24 hores, les mostres van ser centrifugades a 15000 g durant 10 minuts. La fluorescència dels sobrenedants va ser mesurada a les mateixes longituds d'ona abans mencionades. Els valors de fluorescència van ser corregits pel pes de cada pulmó al moment del sacrifici.

3.2.6 Homogeneïtzació del pulmó

Els pulmons esquerres de 24 animals MCAO i 6 animals *sham* van ser homogeneïtzats amb tampó de lisis fresc i refredat (0,5% phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma, Alemanya), 0,1M PMSF (Sigma-Aldrich) i 0,5% Aprotinin (Sigma-Aldrich) diluïts en tampó RIPA comercial (Sigma-Aldrich)). Es van afegir 500 µl del tampó de lisis a cada mostra, i el teixit es va homogeneïtzar amb un trepant homogeneïtzador (broca de 5mm de diàmetre). Posteriorment, el teixit va ser centrifugat a 12000 rpm durant 12 minuts a 4 °C. Els sobrenedants van ser emmagatzemats a -80 °C i els pellets van ser descartats.

La concentració de proteïna total dels homogenats es va mesurar amb el mètode de l'àcid bicinchoninic (BCA, *bicinchoninic acid*) [116] (Pierce™ BCA Protein Assay, ThermoFisher), utilitzant una dilució 1:20. Després d'incubar les mostres 30 minuts a 37°C amb el reactiu, es va llegir l'absorbància a 562 nm amb el lector de plaques

Synergy™ Mx microplate reader (Biotek Instruments). Totes les mostres van ser mesurades per duplicat, i aquelles amb un CV major del 20% van ser repetides per assegurar la quantificació acurada de la concentració de proteïna d'aquella mostra.

3.2.7 Caracterització proteica de BALF i pulmó

Per tal de caracteritzar proteïcament el BALF i el teixit pulmonar dels animals isquèmics, es va realitzar de manera externa un assaig proteòmic, dut a terme per Olink Proteomics (Suècia), el qual permet mesurar de manera simultània 92 proteïnes en una mateixa mostra.

De manera resumida, la tècnica realitzada és un assaig de PEA, en el qual 92 parells anticossos específics per cada proteïna van ser marcats amb oligonucleòtids únics i complementaris (sondes PEA) són afegits a 1 µl de mostra en una placa de 96 pous. Quan cada parell d'anticossos s'uneix a la proteïna corresponent, les sondes lligades als anticossos estan el suficientment properes com per hibridar i generar seqüència diana per a una PCR. Aquesta seqüència és amplificada i detectada utilitzant el procediment de la PCR en temps real.

3.2.8 Mesura de les proteïnes per ELISA

Es van seleccionar 3 proteïnes del panel d'Olink per tal de ser validades per ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en les mateixes mostres en les quals es va realitzar el panell d'Olink. De l'estudi del BALF, es va seleccionar el *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (Mouse HGF DuoSet ELISA, R&D systems, USA). Les proteïnes de l'estudi de pulmó van ser *Transforming Growth Factor-α* (Mouse TGF-α ELISA kit, Elabscience, USA) i CCL2 (Mouse CCL2/JE/MCP-1 DuoSet ELISA, R&D systems), i es van mesurar seguint les instruccions del fabricant. Les densitats òptiques es van llegir amb el Synergy™ Mx microplate reader (BioTek Instruments Inc., USA). Totes les mostres van ser analitzades per duplicat, i els replicats amb un coeficient de variació superior al 20% es van descartar de l'anàlisi estadístic.

3.2.9 Anàlisis estadístics i bioinformàtics

Per als anàlisis estadístics, es van utilitzar tant el software R (versió 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria) com l'Statistical Packages for Social Sciences (version 22; SPSS Inc.; Chicago, IL) i el GraphPad Prism per a la construcció de gràfics (versió 6; GraphPad Software; La Jolla, CA).

La normalitat de les variables es va estudiar gràficament i amb el test de Kolmogorov-Smirnov si la mida mostral era >30, i el test de Shapiro-Wilk si la mida mostral era <30.

Per als anàlisis univariants, es va utilitzar el test T si les variables seguien una distribució normal, i el test de Mann-Whitney si les variables no seguien una distribució normal. Per calcular les correlacions, es va utilitzar la Rho d'Spearman o el coeficient de Pearson en funció de la normalitat de les variables. Les variables normals es representen com a mitjana (\pm SD) i les variables no normals es representen com a mediana (IQR).

Per a l'anàlisi de les dades del Mouse Exploratory Panel d'Olink[®], en primer lloc es van filtrar les dades per eliminar aquelles proteïnes amb més d'un 40% dels valors per sota del límit de detecció. No va caldre cap tipus de pre-processament de les dades ja que es tracta d'una quantificació relativa, les dades de la qual ja estan normalitzades per l'empresa que realitza el panell.

Amb les dades ja preparades, es va procedir a l'anàlisi d'expressió diferencial mitjançant models lineals de Bayes, amb el paquet de Bioconductor *limma* [103]. Per a l'ajust per comparacions múltiples, es va utilitzar el *false discovery ratio* (FDR), i per estudiar la magnitud de les diferències es va emprar el logFC. La significació estadística es va establir quan el FDR era menor a 0.1.

4. RESULTATS

**CAPÍTOL I: VALIDACIÓ DE BIOMARCADORS PREDICTORS DE LA
SAP EN UNA COHORT MULTICÈNTRICA DE PACIENTS**

4.1.1 Anàlisi *interim*

Degut a l'alt nombre de candidats a biomarcadors predictors de SAP a estudiar (seleccionats per bibliografia prèvia), es va voler realitzar un primer anàlisi *interim*, per tal d'estudiar el comportament d'aquests i poder seleccionar els millors per tal d'explorar-los a la cohort sencera.

Aquest anàlisi *interim* es va realitzar amb 38 pacients, aparellats per edat, sexe, NIHSS i disfàgia. 12 d'aquests van desenvolupar SAP en els primers 7 dies després de l'ictus, 4 van desenvolupar UTI i 22 no van tenir cap tipus d'infecció en aquest període de temps. En aquests pacients, es van mesurar 6 molècules diferents. En 3 d'aquestes molècules, no es va detectar cap diferència en entre els pacients que van desenvolupar SAP i els que no en van desenvolupar en cap dels dos temps. Aquestes molècules van ser suPAR, copeptina i la vitamina D-25OH. Per contra, en les proteïnes que sí vam observar alguna diferència entre les dues condicions es troben SAA, CRP i MR-proADM.

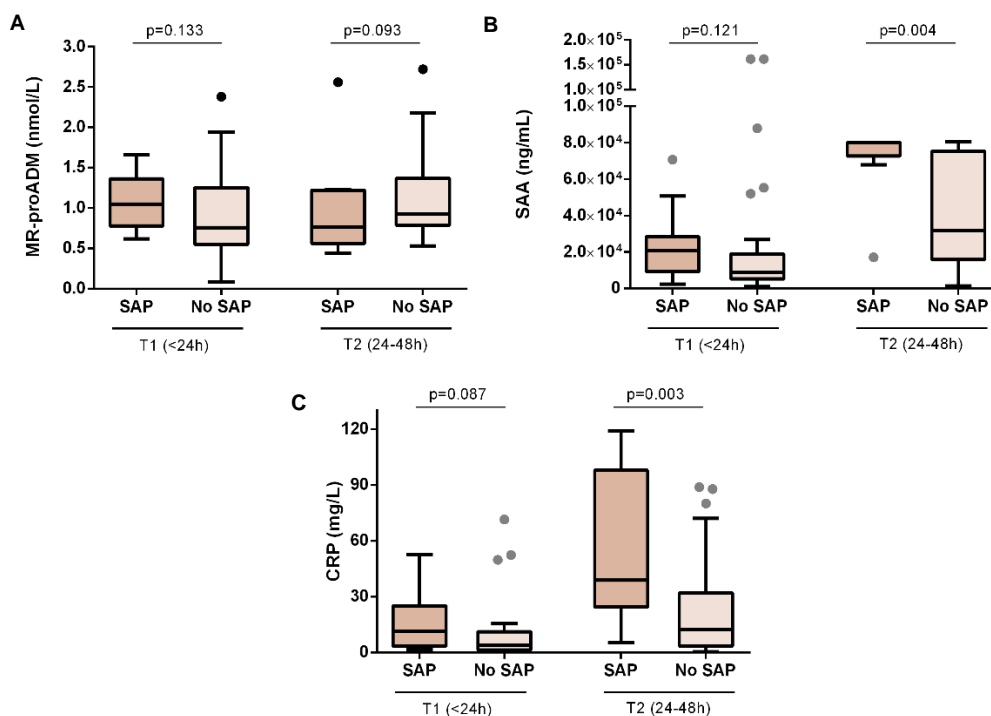


Figura 4. Mesura dels biomarcadors a l'anàlisi interim. Cada proteïna ha estat mesurada en dos temps diferents. La primera mesura es va realitzar amb mostres extretes en les primeres 24 hores després de l'ictus (T1), i la segona mesura es va realitzar en mostres extretes entre les 24 h i les 48 h següents (T2). Els pacients que van desenvolupar UTI estan inclosos al grup No SAP. (A) MR-proADM (B) SAA. (C) CRP.

En el cas de MR-proADM, es va observar una tendència dels pacients amb SAP de tenir elevada aquesta molècula en les primeres 24 hores després de l'ictus (SAP: 1.050 (0.78-

Resultats

1.363) nmol/l vs. No SAP: 0.76 (0.55-1.255) nmol/l, $p=0.13$). No obstant, aquest resultat s'invertia en el T2 (entre les 24 i les 48 hores després de l'ictus), ja que el que observàvem en aquest punt del temps és una tendència dels pacients No SAP a tenir nivells més elevats que els pacients SAP (SAP: 0.76 (0.56-1.22) nmol/l vs. No SAP: 0.92(0.78-1.37), $p=0.092$). Observant la **figura 4A**, es pot apreciar que els nivells d'aquesta molècula no semblen augmentar amb el temps.

Pel que fa a SAA, els nivells d'aquesta molècula es van trobar elevats en els dos temps, essent la diferència més notòria en el T2 (SAP: 80122 (17077-80122) ng/ml vs No SAP: 31822 (15846-75429) ng/ml, $p=0.004$) respecte al T1 (SAP: 20806 (9387-28459) ng/ml vs. No SAP: 20806 (9387-28459) ng/ml, $p=0.121$). A diferència de la proteïna anterior, en aquest cas els nivells d'SAA augmenten amb el pas del temps (**figura 4B**).

Per últim, l'altre marcador on es van trobar diferències entre els pacients que van desenvolupar SAP i els que no és CRP. Aquesta proteïna té un perfil temporal molt semblant a SAA, augmentant en el temps així com fent-se més grans les diferències entre els dos grups en el T2 (SAP: 38.8 (24.5-97.8) mg/l vs. NO SAP: 12.35 (3.43-32.15) mg/l, $p=0.003$) amb respecte al T1 (SAP: 11.35 (3.44-25.20) mg/l vs. 4.005 (1.46-11.2) mg/l, $p=0.087$) (**figura 4C**).

4.1.2 Anàlisi de la cohort completa

Tenint en compte els resultats anteriors, es van seleccionar MR-proADM, SAA i CRP per tal d'explorar-los com a biomarcadors predictors de la SAP en la cohort completa de pacients de l'estudi multicèntric, que són 340 pacients. Es van diagnosticar SAIs en 75 pacients (22.1%), essent 41 d'aquests (12.1%) diagnosticats com a pneumònia pels professionals clínics. La SAP d'acord amb els criteris CDC modificats es va diagnosticar en 26 casos (7.6% de la cohort, 63.4% dels diagnòstics clínics). Les taxes d'ús d'antibiòtics van ser de 88.5% en els pacients que complien criteris CDC modificats, i de 73.3% en aquelles pneumònies diagnosticades pel metge (el 50% dels pacients amb diagnòstic clínic de pneumònia que no complien criteris CDC van rebre antibiòtics). Pel que fa a la resta de SAIs, 17 van ser UTIs (5%) i 18 pacients van patir febre d'origen desconegut (5.3%).

Amb respecte a l'anàlisi descriptiu dels pacients SAP en comparació amb els no SAP, les úniques diferències entre els dos grups les trobem pel que fa a al mRS previ a l'ictus, el valor de l'NIHSS a l'ingrés del pacient i la disfàgia. Els pacients amb SAP tenien unes puntuacions de mRS previ i de NIHSS a l'ingrés i a les 24 hores més alts, així com un

percentatge molt més alt de disfàgia (80.8% vs. 30.3%) (**taula 4**). A més, pel que fa a la etiologia de l'ictus, en els pacients que desenvolupen SAP hi havia un major percentatge d'ictus d'origen cardioembòlic (64% vs 35.9%) i d'origen indeterminat (24% vs 4.7%) en detriment dels ictus d'origen aterotrombòtic i lacunar.

Per altra banda, també val la pena destacar que un 76.9% dels pacients que van desenvolupar SAP ho van fer entre els dies 0 i 3 després de l'ictus.

	No SAP (N=314)	SAP (N=26)	p-valor
Edat	77 (69-85)	80 (65-84)	0.134
Sexe (femení)	176 (56)	15 (57.7)	0.52
Hipertensió	213 (67.8)	20 (76.9)	0.234
Diabetis mellitus	90 (28.7)	11 (42.3)	0.109
Tabac	74 (23.6)	5 (19.2)	0.077
Fibril·lació auricular	67 (21.3)	9 (34.6)	0.097
Malaltia coronària	74 (11.1)	6 (23.1)	0.411
EPOC	32 (10.2)	5 (19.2)	0.139
Ictus previ	45 (14.3)	7 (26.9)	0.082
mRS previ	0 (0-1)	1 (0-2)	0.018*
NIHSS basal	9 (5-17)	18 (12-22)	<0.001‡
NIHSS a les 24h	6 (2-12)	17 (10-23)	<0.001
SBP	140 (135-161.5)	152 (136-170)	0.141
DBP	80 (70-91)	83 (76.5-98.5)	0.085
Disfàgia	95 (30.3)	21 (80.8)	<0.001‡
TOAST			
- CE	107 (35.9)	16 (64)	0.027*
- LAA	64 (21.5)	2 (8)	
- Lacunar	30 (10.1)	0 (0)	
- Indeterminada	14 (4.7)	6 (24)	
- Altres	1 (0.3)	0 (0)	

Taula 4. Anàlisi univariant comparant els pacients SAP i No SAP. Els valors es reporten com a N (%) per a les variables categòriques, i mediana (IQR) per a les variables contínues. mRS: modified Rankin scale; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST: Trial of Org- in Acute Stroke Treatment; CE: cardiac embolism; LAA: large-artery atherothrombosis; *p<0.05, † p<0.01, ‡ p<0.001

Amb respecte als biomarcadors avaluats a la cohort completa, es va poder observar que tots ells s'associen amb el desenvolupament de SAP en els dos temps, tal i com es representa a la **figura 6**. Pel que fa al perfil temporal d'aquestes molècules, i de manera semblant al que es va observar en l'anàlisi *interim*, el que es va veure és que els nivells de MR-proADM es mantenien estables en els dos temps, però els nivells de SAA i CRP augmentaven al T2, més notòriament en els pacients que desenvolupaven SAP. Degut a la semblança dels gràfics i també de les funcions biològiques, es va voler estudiar la correlació entre SAA i CRP, i es va veure que aquestes dues molècules correlacionaven fortament i de manera positiva en els dos temps (T1 – R=0.73, p<0.001; T2 – R=0.78, p<0.001).

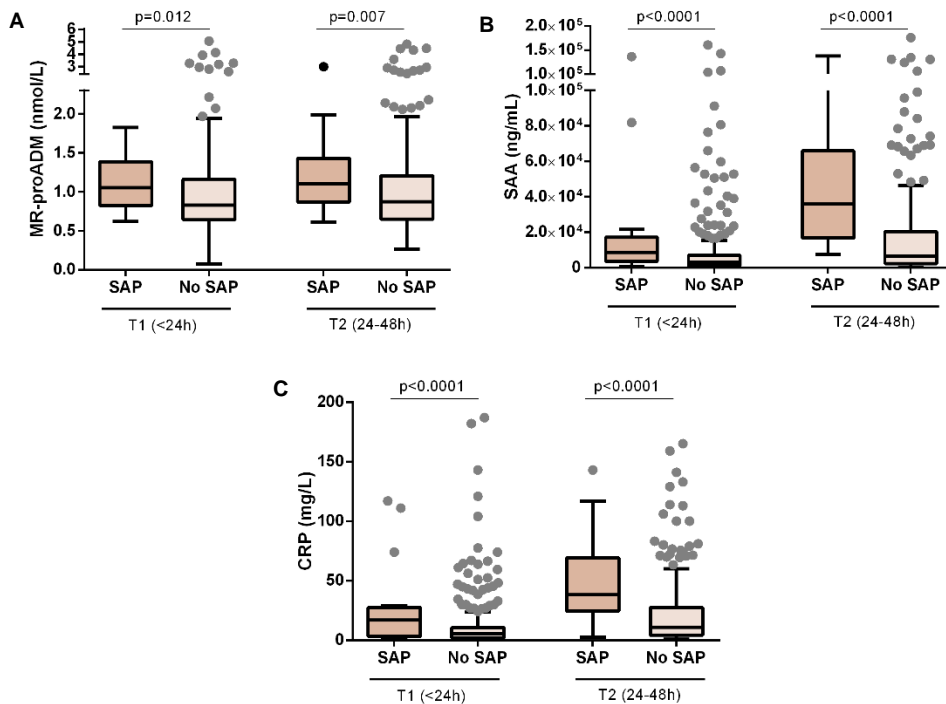


Figura 6. Mesura dels biomarcadors a la cohort completa. Cada proteïna ha estat mesurada en dos temps diferents. La primera mesura es va realitzar amb mostres extretes en les primeres 24 hores després de l'ictus (T1), i la segona mesura es va realitzar en mostres extretes entre les 24h i les 48h següents (T2). Els pacients que van desenvolupar UTI estan incloses al grup No SAP. (A) MR-proADM (B) SAA. (C) CRP.

Per tal d'estudiar el poder predictiu d'aquests biomarcadors per a la SAP, es van construir models de regressió logística binària. Es van realitzar 2 anàlisis independents, un per a cada temps. L'anàlisi del T1 estaria enfocat a la predicció de la SAP, mentre que el del T2 estaria més encarat a la troballa d'una eina que ajudés al diagnòstic precoç de la patologia.

4.1.2.1 Valor predictiu dels biomarcadors al T1

Per a l'anàlisi dels biomarcadors al T1, es va construir en primer lloc un model clínic que inclou factors de risc descrits prèviament a la literatura (i a l'apartat 1.3.2.2 d'aquesta tesi), que són l'edat, el sexe, la fibril·lació auricular, la EPOC i la puntuació en l'escala NIHSS del pacient a l'ingrés. D'aquestes, la variable NIHSS a l'ingrés va ésser l'única que actuava com a predictor independent en aquest model clínic (OR=1.12 (1.05-1.19), $p<0.001$). L'AUC de la corba ROC del model clínic és de 0.77 (0.69-0.86) (**figura 7A**).

Seguidament, es van introduir cada biomarcador per separat al model clínic, i es va observar que tant CRP com SAA actuaven com a predictors independents en els seus respectius models (CRP – OR=1.52 (1.09-2.13), $p=0.014$; SAA – 1.52 (1.12-2.07, $p<0.001$), però no així MR-proADM. Les AUCs de les corbes ROC van incrementar al afegir cadascun dels biomarcadors als models, però aquestes diferències no han resultat significatives després de realitzar el test de De Long (**taula 5**).

Per altra banda, també es va avaluar la predicció d'aquests 3 biomarcadors en conjunt en un panell, seleccionat pel software PanelomiX, i ajustat per a la màxima precisió. El panell resultant estava format per les 3 molècules, establint els següents punts de tall: MR-proADM >0.81 , SAA >3137.8 , CRP >70.5 . El panell es considerà positiu quan 2 o més dels biomarcadors es trobaven per sobre del punt de tall establert. Al construir un model amb el panell de biomarcadors i les variables clíniques, aquest va resultar un predictor independent de SAP (OR=10.1 (3.1-32.6), $p<0.001$). A més, també es va observar un increment significatiu ($p=0.04$) de l'AUC de la corba ROC d'aquest model amb respecte al del model clínic (AUC=0.85 (0.79-0.92)).

4.1.2.2 Valor predictiu dels biomarcadors al T2

Per a l'anàlisi dels biomarcadors extrets al T2, és a dir, entre les 24 i les 48h després de l'ictus, l'estratègia per a l'anàlisi del seu valor predictiu va ser semblant al del T1. Per a la construcció del model clínic també es va incloure l'edat, el sexe, la fibril·lació auricular i la EPOC. En aquest cas, es va optar per afegir-li la puntuació a l'escala NIHSS a les 24h i la disfàgia, ja que en aquest punt temporal ja s'ha pogut avaluar. Aquestes dues últimes variables actuen com a predictors independents dins del model clínic (NIHSS a les 24h – OR=1.11 (1.05-1.18), $p=0.001$; disfàgia – OR=4.22 (1.32-13.5), $p=0.005$). L'AUC de la corba ROC del model clínic per al diagnòstic de la SAP és de 0.86 (0.8-0.92) (**figura 7B**).

Resultats

A l'incloure cadascun dels biomarcadors de manera individual al model clínic, es va poder observar que, igual que en l'anàlisi al T1, tant SAA (OR= 1.94 (1.24-3.03), p=0.003) com CRP (OR=1.86 (1.2-2.89), p=0.005) actuaven com a predictors independents en els seus respectius models, contràriament al que succeeix amb MR-proADM. Les AUCs d'aquests models són lleugerament superiors a les del model clínic, però aquestes diferències no són significatives.

Per últim, també es van construir un panell de biomarcadors amb l'eina PanelomiX, ajustant per a la màxima precisió. De manera similar a l'anàlisi anterior, el software va determinar que el panell per a la màxima precisió consta dels 3 biomarcadors, establint els següents punts de tall: MR-proADM>0.84, SAA>29060.6, CRP>27.4. Es tractava d'un panell altament sensible (sensibilitat 91.3%, especificitat 76.2%), que resulta positiu quan 2 o més biomarcadors es troben per sobre del punt de tall establert. Aquest panell es va incloure també al model clínic construït per al diagnòstic de la SAP, i va resultar un predictor independent (OR=12.38 (3.37-45.49), p<0.001). L'AUC d'aquest nou model és superior al del model amb les variables clíniques (0.92 (0.87-0.97), tenint aquesta diferència una tendència a la significació (p=0.051) (**taula 5**).

AUC de la corba ROC		
	T1 (<24h) – Predicció	T2 (24-48h) – Diagnòstic
Model clínic	0.77 (0.69-0.86)	0.86 (0.8-0.92)
Model clínic + SAA	0.81 (0.75-0.88)	0.91 (0.87-0.95)
Model clínic + CRP	0.80 (0.73-0.87)	0.88 (0.83-0.95)
Model clínic + panell	0.86 (0.79-0.92)	0.92 (0.87-0.97)

Taula 5. Comparació de les AUCs de les corbes ROC dels models. Els valors es reporten com a AUC (95% CI). Els valors en negreta són els AUCs d'aquells models que tenen una diferència significativa o una tendència respecte a l'AUC del model clínic. AUC: area under the curve; ROC: receiver operator characteristic; CI: interval confidence

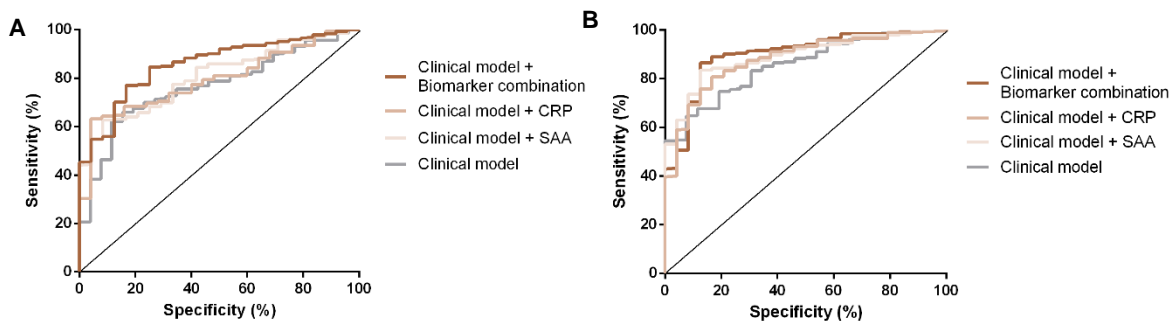


Figura 7. Corbes ROC dels models construïts per a cada temps. (A) Corba ROC superposant el model clínic, el model clínic amb el panel de biomarcadors, el model clínic amb CRP i el model clínic amb SAA per al T1 (<24h). (B) Corba ROC superposant el model clínic, el model clínic amb el panel de biomarcadors, el model clínic amb CRP i el model clínic amb SAA per al T2 (24-48h).

**CAPÍTOL II: TÈCNiques -ÒMIQUES PER AL DESCobRIMENT DE
NOUS BIOMARCADORS PER A LA SAP**

4.2.1 Fase de descobriment

Es van estudiar els perfils d'expressió gènica i proteica de les 3 principals subpoblacions leucocitàries (limfòcits – CD3+, monòcits – CD14+ i neutròfils – CD16+) i de la sang total de pacients amb ictus, 6 havent desenvolupat SAP i 6 sense haver desenvolupat cap tipus d'infecció (que anomenarem No SAP). Els anàlisis de cada grup de mostres es van realitzar de manera independent.

4.2.1.1 Anàlisi multiòmic de les cèl·lules CD3+

Pel que fa a l'anàlisi transcriptòmic de les cèl·lules CD3+, totes les mostres van passar el control de qualitat. Com es pot observar en el PCA (**figura 8A**), cap dels dos components principals separa de manera clara les dues condicions. Si ens fixem en el *heatmap* (**figura 8B**), es podia observar certa diferenciació entre alguns individus dels dos grups, però hi ha dues mostres en el grup del SAP que es comporten de manera més similar als pacients No SAP.

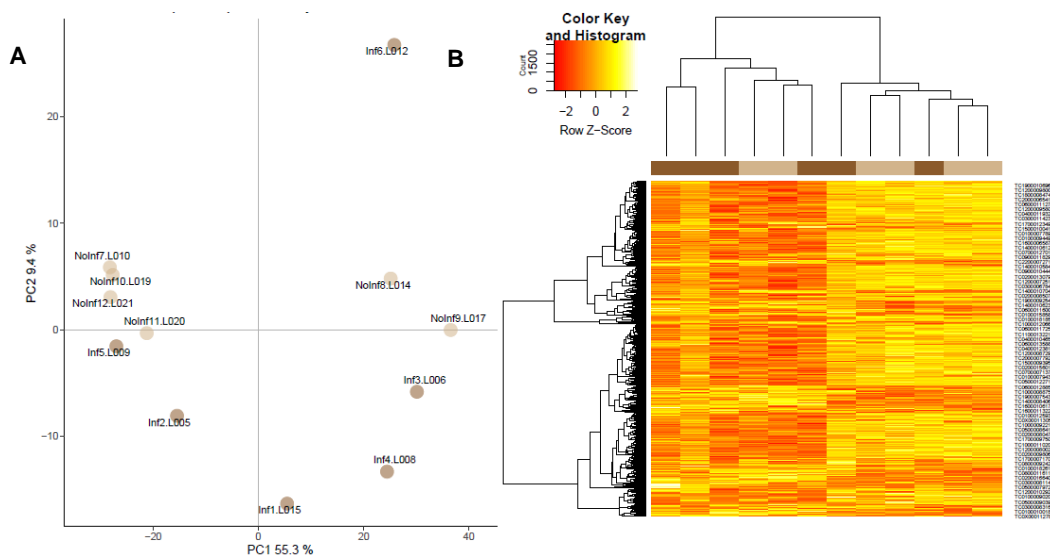


Figura 8. PCA (A) i heatmap (B) de l'anàlisi transcriptòmic de les cèl·lules CD3+. El color marró fos indica les mostres dels pacients SAP, i el marró clar les mostres No SAP

Amb respecte a l'anàlisi d'expressió diferencial, només es van trobar 3 gens diferencialment expressats tenint en compte un llindar estricte (FDR<0.25). Si ens fixem en el p-valor cru, es van trobar 137 gens amb un p-valor<0.05. A la **taula 6**, es representen els 10 gens més diferencialment expressats en els pacients SAP amb respecte als No SAP.

Gen	logFC	p-value	FDR	Codi Entrez
S100A8	2,937	0,000	0,053	6279
VCAN	2,316	0,000	0,186	1462
S100A12	2,490	0,000	0,186	6283
FCER1G	1,862	0,000	0,264	2207
DUSP6	1,277	0,000	0,264	1848
JUN	1,820	0,000	0,264	3725
CD163	1,786	0,000	0,264	9332
S100A9	1,779	0,001	0,279	6280
SLC11A1	1,645	0,001	0,279	6556
CHST15	1,520	0,001	0,279	51363

Taula 6. Top table de l'expressió de gens en els limfòcits. Es mostren els 10 gens més diferencialment expressats. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

Per altra banda, es va realitzar un anàlisi proteòmic amb les cèl·lules CD3+ aïllades dels mateixos pacients per tal de comparar l'expressió proteica d'aquestes cèl·lules en els dos grups (SAP vs no SAP). En aquestes cèl·lules, es van identificar 1097 proteïnes amb més d'un pèptid detectat, que són les que es van incloure en el posterior anàlisi.

D'aquestes 1097, no es va trobar cap proteïna diferencialment expressada tenint en compte el llindar més estricte, i al considerar el llindar més lax, es van observar 133 proteïnes diferencialment expressades entre els dos grups (**taula 7**).

Proteïna	logFC	p-value	FDR	Codi Uniprot
TDP52L2	0.858	0.000	0.307	O43399
CEACAM8	-1.148	0.000	0.307	P31997
DCPS	0.686	0.001	0.307	Q96C86
DBI	0.489	0.001	0.307	P07108
OXCT1	0.794	0.002	0.307	P55809
NDUFV2	0.914	0.002	0.307	P19404
PSMD2	-0.409	0.002	0.307	Q13200
CPNE3	-0.480	0.003	0.307	O75131
COPE	0.821	0.003	0.307	O14579
PFDN2	0.603	0.004	0.307	Q9UHV9

Taula 7. Top table de l'expressió de proteïna en els limfòcits. Es mostren les 10 proteïnes més diferencialment expressats. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

Es va estudiar si hi havia alguna molècula que estigués alterada tant a nivell gènic com a nivell proteic, però no se n'ha trobat cap que estigui diferencialment expressada en l'anàlisi transcriptòmic i proteòmic.

4.2.1.2 Anàlisi multiòmic de les cèl·lules CD14+

Pel que fa a l'estudi de l'expressió gènica de les cèl·lules CD14+, podem observar que el segon component del PCA (**figura 9A**) separa en certa manera els dos grups a comparar, i aquests que tenen un cert perfil d'expressió diferencial (**figura 9B**). Tot i això, el nombre de gens diferencialment expressats entre cèl·lules dels pacients SAP i no SAP no és gaire elevat.

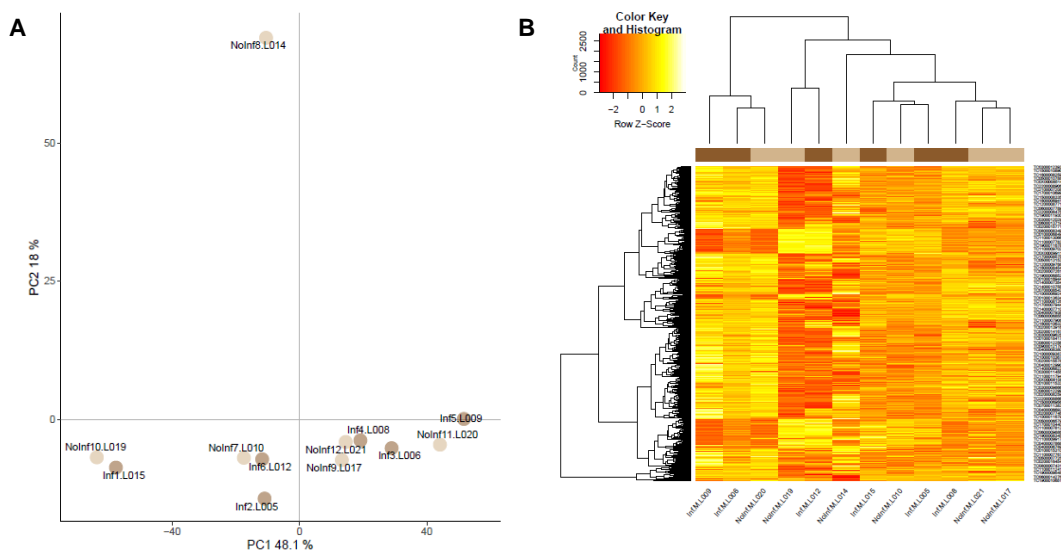


Figura 9. PCA (A) i heatmap (B) de l'anàlisi transcriptòmic de les cèl·lules CD14+. El color marró fos indica les mostres dels pacients SAP, i el marró clar les mostres No SAP.

Troblem 2 gens diferencialment expressats, l'expressió dels quals està més elevada en grup dels pacients amb SAP (FDR <0.25). Tenint en compte un p-valor cru <0.05 (punt de tall menys restrictiu), de gens diferencialment expressats en trobem 148. A la **taula 8** podem trobar els 10 gens més diferencialment expressats de la comparació.

Gen	logFC	p-value	FDR	Codi Entrez
GCA	2,331	0,000	0,226	25801
ADM	2,060	0,000	0,226	133
RETN	1,993	0,000	0,292	56729
PRDM1	-2,022	0,001	0,518	639
LY86	1,972	0,001	0,527	9450
DUSP2	-1,729	0,001	0,683	1844
CD83	-2,205	0,002	0,683	9308
GSTO1	1,554	0,002	0,683	9446
TNFAIP3	-1,610	0,002	0,683	7128
ZSWIM7	1,533	0,002	0,683	125150

Taula 8. Top table de l'expressió de gens en les cèl·lules CD14+. Es mostren els 10 gens més diferencialment expressats. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

Amb respecte a l'estudi de proteòmica, en aquest cas es van identificar 837 proteïnes, en les quals es va detectar més d'un pèptid pertanyent a la proteïna en concret. Després de realitzar l'anàlisi d'expressió diferencial, tampoc es va trobar cap proteïna diferencialment ajustada aplicant el filtre del p-valor ajustat ($FDR < 0.25$). Considerant el p-valor cru ($p\text{-valor} < 0.05$), es van identificar 40 proteïnes diferencialment expressades, les 10 primeres de les quals es representen a la **taula 9**.

Gen	logFC	p-value	FDR	Codi Uniprot
CNDP2	-0.411	0.009	0.865	55748
DEFA1	0.485	0.010	0.865	1667
MATR3	0.323	0.010	0.865	9782
AKAP13	0.551	0.012	0.865	11214
TXNRD1	0.525	0.012	0.865	7296
LYZ	0.388	0.016	0.865	4069
SLC25A11	-0.488	0.018	0.865	8402
CD55	0.335	0.020	0.865	1604
USP14	-0.494	0.020	0.865	9097
GPX1	-0.520	0.021	0.865	2876

Taula 9. Top table de l'expressió de proteïna en les cèl·lules CD14+. Es mostren les 10 proteïnes més diferencialment expressades. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

En aquest cas, tampoc es va trobar cap molècula que tingués l'expressió alterada a nivell gènic i a nivell proteic.

4.2.1.3 Anàlisi multiòmic de les cèl·lules CD16+

Les cèl·lules CD16+ també van ser estudiades, tant a nivell transcriptòmic com proteòmic. Pel que fa a l'anàlisi de la seva expressió gènica, tant en el PCA com en el *heatmap* podem observar que sí es separen amb bastanta claredat els dos grups d'estudi, tot i que hi ha una mostra que té un perfil d'expressió més semblant al grup dels pacients No SAP, pertanyent al grup SAP. En el PCA es pot observar que el primer component t separa els dos grups, la citada mostra del grup SAP (**figura 10**).

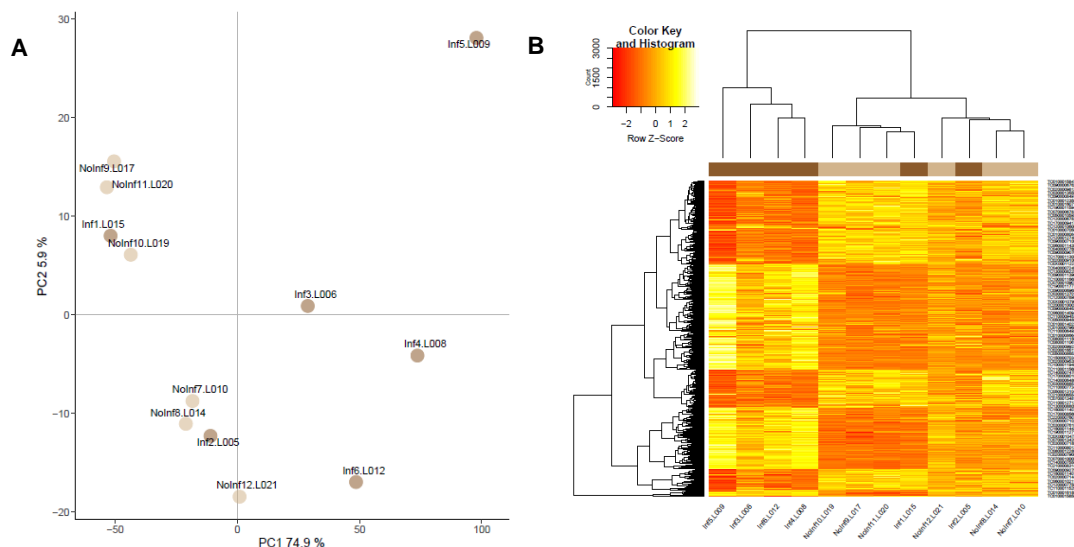


Figura 10. PCA (A) i heatmap (B) de l'anàlisi transcriptòmic de les cèl·lules CD16+. El color marró fos indica les mostres dels pacients SAP, i el marró clar les mostres No SAP.

Pel que fa a l'anàlisi d'expressió diferencial, aquest és el tipus cel·lular en el qual trobem més gens diferencialment expressats, i amb diferència respecte als tipus cel·lulars anteriors. En aquest cas, trobem 3096 gens diferencialment expressats els pacients SAP respecte als No SAP ($FDR < 0.25$), i 1777 si tenim en compte el p-valor sense ajustar ($p < 0.05$) (**taula 10**).

Gen	logFC	p-value	FDR	Codi Entrez
TMEM144	-1.21653	0.000	0.077	55314
CP	-1.56549	0.000	0.077	1356
MYH10	-1.87847	0.000	0.077	4628
LCLAT1	-2.02893	0.000	0.077	253558
OR2L8	-1.63885	0.000	0.077	391190
MAL2	-1.92109	0.000	0.077	114569
OR8J3	-1.58805	0.001	0.077	81168
OR6C74	-1.38853	0.001	0.077	254783
N4BP1	2.785686	0.001	0.077	9683
RPS21	2.00426	0.001	0.077	6227

Taula 10. Top table de l'expressió de proteïna en les cèl·lules CD16+. Es mostren els 10 gens més diferencialment expressats. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

Després de realitzar l'anàlisi de proteòmica, en aquestes cèl·lules es va detectar un nombre inferior de proteïnes que en la resta. Tot i així, el nombre de proteïnes diferencialment expressades és major que en els tipus cel·lulars anteriors. De fet, trobem 87 proteïnes diferencialment expressades, tant tenint en compte el punt de tall més estricte (FDR<0.25) com el més laxe (p-valor cru<0.05) (taula 11).

Proteïna	logFC	p-value	FDR	Codi Uniprot
VCP	-1.177	1.1E-06	4.9E-04	P55072
PGLYRP1	-0.851	2.9E-04	5.4E-02	O75594
CHI3L1	-0.597	3.7E-04	5.4E-02	P36222
CHP1	-0.745	7.5E-04	8.2E-02	Q99653
HNRNPUL1	-0.404	1.2E-03	8.6E-02	Q9BUJ2
CHIT1	-0.430	1.2E-03	8.6E-02	Q13231
WDR1	0.447	1.5E-03	8.6E-02	O75083
PRTN3	-0.587	1.6E-03	8.6E-02	P24158
CAPZA1	0.756	2.0E-03	8.6E-02	P52907
GYG1	0.422	2.1E-03	8.6E-02	P46976

Taula 11. Top table de l'expressió de proteïna en les cèl·lules CD16+. Es mostren les 10 proteïnes més diferencialment expressats. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

En aquest cas, i com seria esperable, sí que trobem molècules que estan alterades tan a nivell gènic com a nivell proteic (FDR<0.25), i en són concretament 37.

4.2.1.4 Anàlisi transcriptòmic de l'RNA de sang total

A més de l'anàlisi transcriptòmic i proteòmic dels tipus cel·lulars abans mencionats, també es va estudiar l'expressió gènica en l'RNA provinent de sang total. En aquest cas, no s'aprecia cap tipus de patró que diferenciï els dos grups, ni tampoc en el PCA cap dels dos components és capaç de separar els grups d'estudi. Així mateix, només trobem 2 gens diferencialment expressats ($FDR < 0.25$) després de realitzar l'anàlisi d'expressió diferencial. Aquest número augmenta fins a 277 si tenim en compte el llindar establert per al p-valor cru ($p\text{-valor} < 0.05$) (**taula 12**).

Gen	logFC	p-value	FDR	Codi Entrez
GADD45A	1.344	0.000	0.189	1647
IFT52	-1.002	0.000	0.197	51098
PDZK1IP1	-1.158	0.000	0.299	10158
ASPH	0.789	0.000	0.301	444
BMP6	0.890	0.000	0.301	654
CDK5RAP2	0.992	0.001	0.301	55755
CHI3L1	-0.797	0.001	0.301	1116
CACNA1E	0.871	0.001	0.338	777
B3GNT2	0.693	0.001	0.338	10678
SLC26A8	0.891	0.001	0.373	116369

Taula 12. Top table de l'expressió gènica en les l'RNA de sang total Es mostren els 10 gens més diferencialment expressats. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

4.2.1.5 Diagrames de Venn

Un cop realitzats els anàlisis de tots els grups es va voler identificar molècules diferencialment expressades comuns entre diferents tipus cel·lulars. Per això, es van utilitzar diagrames de Venn.

En el cas de l'anàlisi de la transcriptòmica, seleccionant el cut-off de p-valor cru < 0.05 , es van trobar 3 gens diferencialment expressats en tots els tipus cel·lulars i en l'RNA de sang total (*PYGL*, *CXCL16* i *PLBD1*), i 5 que es trobaven diferencialment expressats en tots els tipus cel·lulars estudiats (*JUN*, *SERPINA1*, *ANPEP*, *TREM1* i *CR1*) (**figura 11A**). En l'anàlisi de proteòmica, només trobem una proteïna diferencialment expressada en tots els tipus cel·lulars, i és la neutrophil defensin 1 (**figura 11B**).

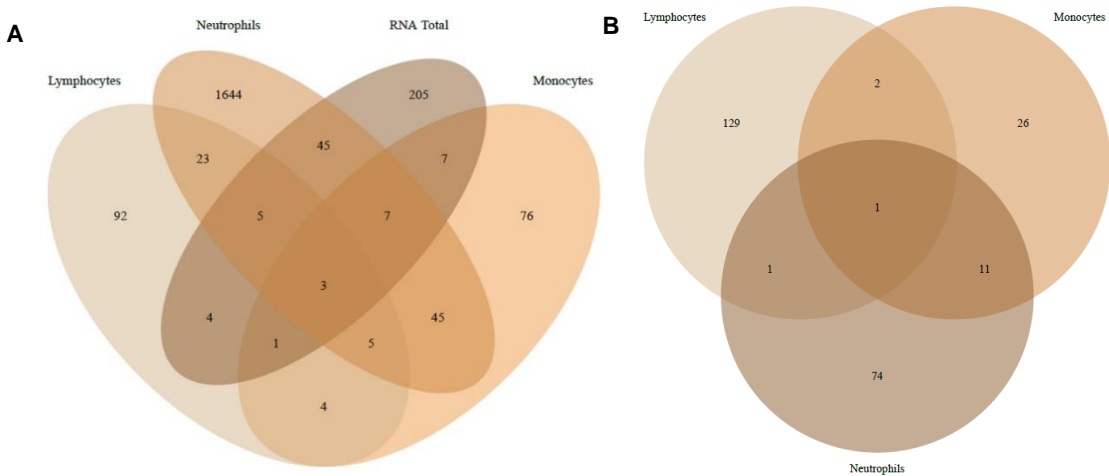


Figura 11. Diagrames de Venn. (A) Diagrama de Venn dels gens significatius a l'estudi de transcriptòmica, seleccionant aquells gens amb un p-valor cru<0.05. (B) Diagrama de Venn de les gens significatives a l'estudi de proteòmica, seleccionant aquells gens amb un p-valor cru<0.05.

4.2.2 Fase de qualificació

4.2.1.4 Anàlisi de l'expressió dels gens seleccionats

En aquesta fase, es van seleccionar els 3 gens més diferencialment expressats en cada grup, i es van estudiar en el tipus cel·lular corresponent en un nou grup de 22 pacients (11 SAP, 11 No SAP).

En primer lloc, es va voler comprovar la puresa de les subpoblacions cel·lulars mitjançant la mesura de l'expressió gènica de 3 marcadors específics en totes les mostres. El gen *THEMIS* té una expressió específica als limfòcits, el *ASGR2* per als monòcits i *AZU1* per als neutròfils.

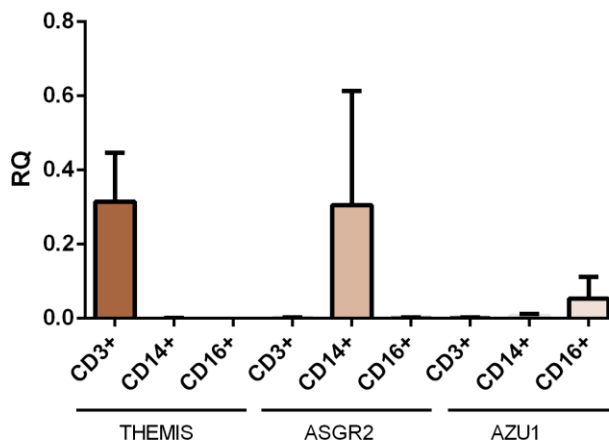


Figura 12. Marcadors específics de cada subpoblació leucocitària. *THEMIS* és un marcador específic de limfòcits (CD3+), *ASGR2* és un marcador específic de monòcits (CD14+) i *AZU1* és un marcador específic de neutròfils (CD16+)

Els resultats indiquen es tractava de subpoblacions pures, ja que com podem veure a la **figura 12**, cada tipus cel·lular només té una expressió marcada per al seu corresponent marcador gènic.

Respecte als resultats obtinguts en cada gen seleccionat, aquests es representen a la **taula 13**. En el cas de les cèl·lules CD3+, en dos dels 3 gens seleccionats (S100A8 i S100A12) es van trobar diferències significatives en la seva expressió en els pacients SAP vs. els No SAP. Pel que fa a les cèl·lules CD14+, observem una tendència a la significació en els gens *ADM* i *RETN*. Malauradament, en el cas dels 3 candidats seleccionats en la comparació de les cèl·lules CD16+, l'expressió d'aquests gens no s'ha pogut detectar amb la tècnica emprada. Per últim, en el cas de l'estudi de l'RNA total, només la diferència en el gen *GADD45A* sembla tenir una tendència a la significació estadística.

Gen	Grup estudiat	p-valor
S100A8	CD3+	0.007**
VCAN	CD3+	0.132
S100A12	CD3+	0.036*
GCA	CD14+	0.387
ADM	CD14+	0.051#
RETN	CD14+	0.099#
TMEM144	CD16+	No detectat
CP	CD16+	No detectat
MYH10	CD16+	No detectat
GADD45A	RNA de sang total	0.094#
PDZK1IP	RNA de sang total	0.138
IFT52	RNA de sang total	0.844

Taula 13. Gens estudiat a la fase de qualificació. Es mostren els gens estudiats en aquesta fase, el grup on s'ha estudiat i el p-valor corresponent obtingut. #p<0.1, *p<0.05, **p<0.01

4.2.1.4 Anàlisi de l'expressió de les proteïnes seleccionades

Es va realitzar una qualificació dels resultats obtinguts en l'anàlisi de proteòmica en els mateixos pacients del punt anterior (11 SAP vs. 11 No SAP). En aquest cas, només es van seleccionar les 3 proteïnes més diferencialment expressades en les cèl·lules CD16+, ja que els resultats de la resta de subpoblacions no eren prou significatius com per triar-les.

Resultats

Aquestes 3 proteïnes triades van ser VCP, PGRS-P i YKL-40. La tècnica emprada per a la mesura d'aquestes proteïnes va ser Western Blot, però en el cas de VCP i PGRS-P l'anticòs adquirit no va ser capaç de donar-nos cap mena de senyal. En el cas de YKL-40 sí que observàvem una banda clara al pes molecular corresponent d'aquesta proteïna, i després de la corresponent quantificació, no es va observar una diferència significativa entre els pacients que van desenvolupar SAP i els que no.

**CAPÍTOL III: ANÀLISI RETROSPECTIU DE BIOMARCADORS
SANGUÍNIS PER A LA PREDICCIÓ PRECOÇ DE COMPLICACIONS
ASSOCIADES A L'ICTUS**

4.3.1 Anàlisi descriptiu

938 pacients de l'estudi Stroke-Chip amb ictus isquèmic van ser inclosos en aquest estudi retrospectiu. 19 d'aquests pacients van patir ADHF (2%), i 86 pacients van desenvolupar RTI (9.1%). Es van registrar 9 individus amb les dues complicacions post-ictus. Respecte a l'estudi descriptiu, els pacients amb 1 o ambdues complicacions eren més grans, amb taxes més altes de fibril·lació auricular, una puntuació de l'escala NIHSS a l'ingrés més alta i una puntuació a l'escala mRS també més alta (**taula 14**).

	ADHF			RTI		
	No (N=919)	Sí (N=19)	p-valor	No (N=852)	Sí (N=86)	p-valor
Edat	72.52 (±13)	81.1 (±13.5)	<0.0001‡	72.2 (±13)	77.2 (±12.3)	0.001†
Sexe (femení)	420 (45.7%)	11 (57.9%)	0.291	388 (45.6%)	42 (48.8%)	0.572
Hipertensió	675 (73.4%)	13 (68.4%)	0.624	617 (72.6%)	69 (80.2%)	0.127
Dislipèmia	451 (49.1%)	9 (47.4%)	0.883	421 (49.5%)	38 (44.2%)	0.345
Diabetes mellitus	237 (25.8%)	2 (10.5%)	0.184	214 (25.2%)	25 (29.1%)	0.430
Tabac	149 (16.2%)	3 (15.8%)	0.999	144 (16.9%)	8 (9.3%)	0.067
Alcohol	64 (7%)	1 (5.3%)	0.999	64 (7.5%)	1 (1.2%)	0.027*
Fibril·lació auricular	318 (34.6%)	11 (57.9%)	0.035*	282 (33.2%)	46 (53.5%)	<0.0001‡
Malaltia coronària	145 (15.8%)	7 (36.8%)	0.023*	132 (15.5%)	19 (22.1)	0.115
Ictus previ	158 (17.2%)	5 (26.3%)	0.353	144 (16.9%)	18 (20.9%)	0.351
mRS previ	0 (0-1)	1.5 (0-3)	0.001‡	0 (0-1)	1 (0-3)	<0.0001‡
NIHSS basal	9 (±7.3)	15 (±4.9)	<0.0001‡	8.5 (±7.1)	15.5 (±6)	<0.0001‡
TOAST						
- CE	330 (40.7%)	11 (84.6%)	0.050	337 (40.1%)	46 (55.4%)	0.007†
- LAA	116 (14.3%)	0 (0%)		115 (13.7%)	10 (12%)	
- Lacunar	109 (11.9%)	0 (0%)		119 (14.1%)	2 (2.4%)	
- Indeterminada	240 (29.6%)	2 (15.4%)		255 (30.3%)	22 (26.5%)	
- Altres	15 (1.9%)	0 (0%)		15 (1.8%)	3 (3.6%)	
Mortalitat hospitalària	108 (9.9%)	8 (42.1%)	<0.0001‡	44 (5.2%)	30 (34.9%)	<0.0001‡
Discapacitat als 3 mesos	366 (42.2%)	16 (84.32%)	<0.0001‡	221 (32.6%)	67 (89.3%)	<0.0001‡

Taula 14. Anàlisi univariant per a ADHF i RTI després de l'ictus. Els valors es reporten com a N (%) per a les variables categòriques, i mitjana (±SD) per a les variables contínues. RTI: respiratory tract infection; mRS: modified Rankin scale; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST: Trial of Org- in Acute Stroke Treatment; CE: cardiac embolism; LAA: large-artery atherothrombosis; *p<0.05, † p<0.01, ‡ p<0.001.

A més, també es van reportar taxes més altes de mortalitat durant l'ingrés hospitalari i de discapacitat als 3 mesos (**taula 14**). Pel que fa als pacients amb ADHF, aquests patien més de malalties coronàries respecte als que no van desenvolupar ADHF. En canvi, els pacients amb RTI tenien nivells més alts de glicèmia.

D'entre totes les molècules analitzades, els pacients amb ADHF tenien nivells més alts en plasma de D-dímer, NT-proBNP, TNF-R1 i VAP-1 respecte els pacients sense la complicació. Per altra banda, en els pacients que van desenvolupar RTI es van trobar nivells més elevats de D-dímer, endostatina, IL-6, NTpro-BNP i vWF. Els valors de cada biomarcador es poden trobar a la **taula 15**.

	ADHF			RTI		
	No (N=919)	Sí (N=19)	p-valor	No (N=852)	Sí (N=86)	p-valor
Apo-CIII	4.02 (±0.97)	3.68 (±0.98)	0.144	4.01 (±0.98)	3.99 (±0.93)	0.778
D-dímer	4.08 (±0.95)	4.60 (±0.79)	0.020*	4.05 (±0.94)	4.53 (±0.93)	<0.0001‡
Endostatina	4.11 (±0.94)	4.50 (±0.89)	0.073	4.09 (±0.93)	4.35 (±1.08)	0.015*
GROA	3.99 (±0.97)	3.96 (±0.87)	0.881	4.00 (±0.98)	3.94 (±0.93)	0.582
IL-6	4.00 (±0.96)	4.24 (±0.77)	0.265	3.95 (±0.94)	4.49 (±1.02)	<0.0001‡
NT-proBNP	4.12 (±0.95)	5.03 (±0.87)	<0.0001‡	4.11 (±0.95)	4.45 (±0.91)	0.001***
VAP-1	4.05 (±0.99)	4.79 (±1.05)	0.001‡	4.05 (±0.98)	4.19 (±1.12)	0.199
vWF	4.02 (±0.97)	4.25 (±0.88)	0.306	3.97 (±0.97)	4.49 (±0.89)	<0.0001‡
IGFBP3	4.00 (±0.98)	3.91 (±1.07)	0.694	3.99 (±0.98)	4.10 (±1.05)	0.330
FasL	3.96 (±0.99)	4.40 (±0.72)	0.056	3.95 (±0.99)	4.16 (±0.99)	0.065
TNF-R1	4.04 (±0.98)	4.36 (±0.52)	0.038*	4.04 (±0.97)	4.17 (±1.03)	0.235
NCAM	3.98 (±0.99)	4.36 (±0.76)	0.090	3.99 (±0.98)	3.91 (±1.03)	0.498
S100B	4.03 (±0.98)	3.72 (±0.87)	0.233	4.02 (±0.99)	3.95 (±0.91)	0.558
Hsc70	4.04 (±0.95)	4.18 (±1.09)	0.567	4.04 (±0.95)	4.13 (±0.92)	0.414

Taula 15. Biomarcadors mesurats en els pacients d'aquest estudi. Els valors es reporten com mitjana (±SD). Les abreviacions es troben al principi de la tesi. *p<0.05, † p<0.01, ‡ p<0.001.

4.3.2 Valor predictiu dels panells seleccionats

Amb l'eina PanelomiX, es va seleccionar el panel de biomarcadors més acurat per a la predicció de cada complicació. Per a la predicció de ADHF, es va seleccionar un panell que inclou VAP-1>5.67, NT-proBNP>4.98 i D-dímer>5.38. El panel es considera com a positiu quan com a mínim algun dels 3 biomarcadors es troba per sobre del punt de tall. El panell té una especificitat del 71.5% i una sensibilitat del 89.5% (**figura 15B**).

També es va seleccionar un panell per a la predicció de RTI. En aquest cas, el panell incloïa IL-6>3.97, vWF>3.67 i D-dímer>4.58. Aquest panell es considera positiu quan almenys 2 dels marcadors es troben per sobre del punt de tall seleccionat, i té una especificitat del 59.8% i una sensibilitat del 82.9% (**figura 14**). Dels 9 pacients amb les dues complicacions, 9 d'ells van ser positius per als dos panells, 1 pacient només va ser positiu per al panell de RTI i un altre pacient va resultar negatiu pels dos panells.

Per tal d'avaluar la capacitat predictora d'aquests panells, es van construir dos models de regressió logística binària, un per cada complicació. Els panells de biomarcadors seleccionats van resultar predictors independents per a la seva corresponent complicació [OR=11.85 (2.67-53.74), p=0.001 per a ADHF; OR=3.73 (1.95-7.15), p<0.0001 per a RTI], després d'ajustar per variables clíniques (**taula 16**).

	ADHF		RTI	
	Model clínic	Model clínic + panell de bks	Model clínic	Model clínic + panell de bks
Regressió logística (OR)				
NIHSS a l'ingrés	1.09 (1.02-1.16), p=0.006†	1.06 (1-1.14), p=0.048*	1.12 (1.09-1.16), p<0.0001‡	1.10 (1.07-1.14), p<0.0001‡
Edat	1.04 (0.99-1.11), p=0.07	1.02 (0.98-1.08), p=0.26	1.02 (1-1.04), p=0.02*	1.01 (0.99-1.03), p=0.2
Malaltia coronària	3.24 (1.18-8.44), p=0.02*	2.8 (1.01-7.36), p=0.047*	-	-
Sexe (femení)	1.36 (0.5-3.83), p=0.52	1.16 (0.43-3.26), p=0.76	0.8 (0.51-1.35), p=0.38	0.8 (0.5-1.3), p=0.37
Combinació de bks	-	10.1 (3-52.2), p<0.0001‡	-	3.73 (2.06-6.75), p<0.0001‡
Corba ROC				
AUC	0.80 (0.70-0.88)	0.88 (0.83-0.93)	0.78 (0.73-0.82)	0.81 (0.77-0.88)
Test de De Long	-	p=0.038*	-	p=0.048*
AUC validació creuada	0.79 (0.72-0.87)	0.87 (0.82-0.92)	0.78 (0.74-0.83)	0.82 (0.78-0.85)
Test de De Long	-	p=0.02*	-	p=0.002†

Taula 16. Anàlisi de regressió logística i valor predictiu addicional del panell de biomarcadors sanguinis. La taula representa la comparació de models predictius, per una banda el model clínic i per l'altra el mateix model afegint-hi el panell de biomarcadors. Per a la regressió logística, s'indiquen els OR (95% CI) i el respectiu p-valor. Per a l'avaluació de la capacitat predictiva, es representa l'AUC de la corba ROC dels models, així com l'AUC després de realitzar la validació creuada. Bks: biomarkers. La resta d'abreviacions es troben al principi de la tesi.

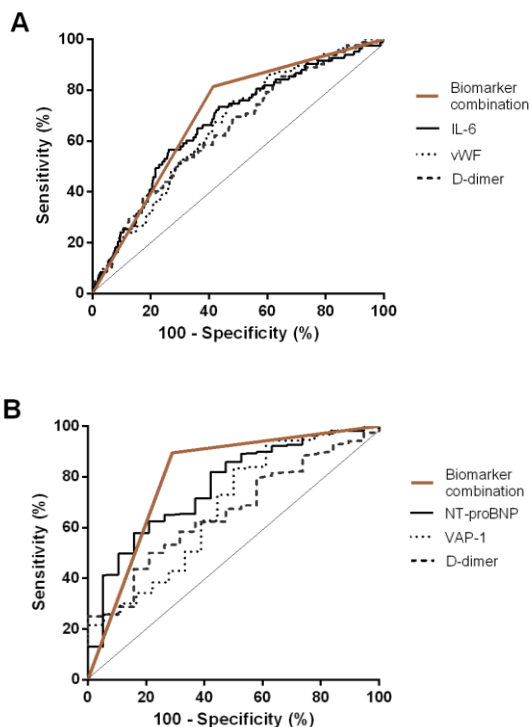


Figura 14. Corbes ROC de cada biomarcador per separat i en combinació. (A) Corba ROC per RTI del panell de biomarcadors (línia marró), D-dimer (línia de ratlles), vWF (línia de punts) i IL-6 (línia negra). (B) Corba ROC per ADHF del panell de biomarcadors (línia marró), D-dimer (línia de ratlles), VAP-1 (línia de punts) i NT-proBNP (línia negra).

Es van seleccionar el sexe, l'edat i l'NIHSS basal com a variables confusores en ambdós models degut a la seva influència en el desenvolupament de les dues complicacions. A més, en el cas de ADHF, la malaltia coronària també es va incloure al seu corresponent model ja que ha estat reportat com a un factor de risc per a ADHF. No es va detectar multicol·linealitat en cap dels models.

L'addició dels panells de biomarcadors als models de regressió logística va millorar la precisió dels models clínics per ambdós complicacions pel que fa a l'AUC. En el cas de ADHF, aquest augmentava de 0.8 (0.7-0.88 a 0.88 (0.83-0.93) ($p=0.038$). Per altra banda, si ens fixem en RTI, aquest augment és més lleuger, anant des de 0.787 (0.73-0.82) fins a 0.81 (0.77-0.88) ($p=0.048$) (**taula 6**).

Per tal de validar de manera interna els resultats obtinguts, es va realitzar una CV de 10 iteracions. Els increments de l'AUC també es van observar després de la validació interna dels resultat. Els resultats de la validació creuada estan presentats a la **taula 16**, i totes les corbes ROC es representen a la **figura 15**.

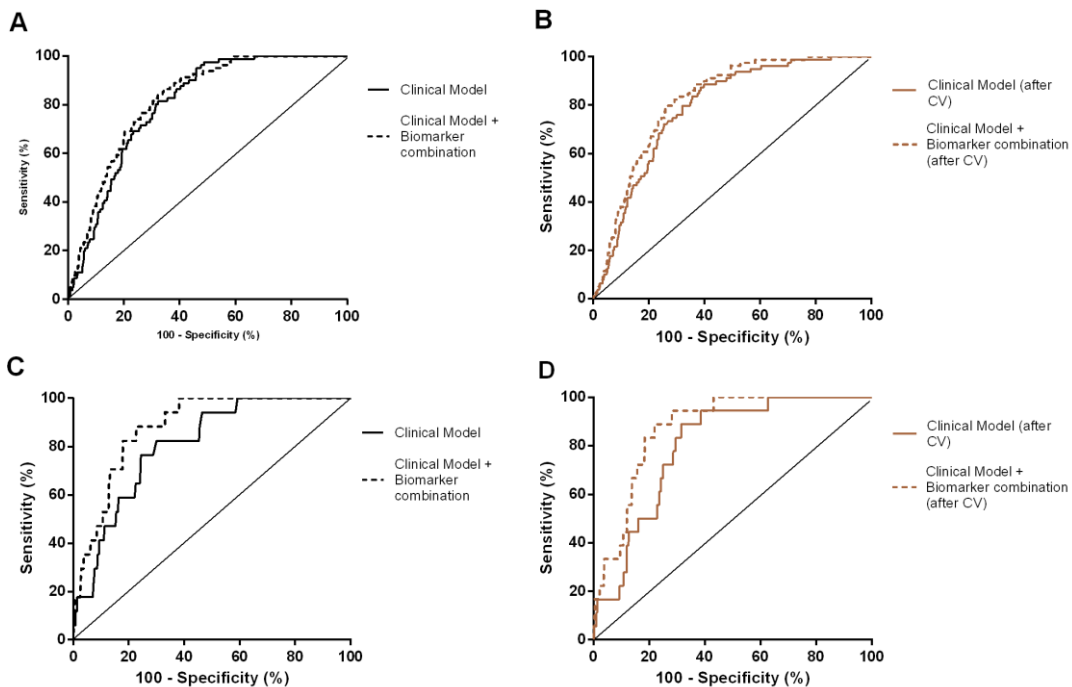


Figura 15. Corbes ROC dels models construïts per a cada complicació. A i B representen els models construïts per a RTI, i C i D representen els models construïts per a ADHF. (A) Corba ROC superposant el model clínic i el model clínic amb el panel de biomarcadors per a RTI. (B) Corba ROC superposant el model clínic i el model clínic amb el panel de biomarcadors per a RTI després de la CV. (C) Corba ROC superposant el model clínic i el model clínic amb el panel de biomarcadors per a ADHF. (D) Corba ROC superposant el model clínic i el model clínic amb el panel de biomarcadors per a ADHF després de la CV. Les abreviacions es troben al principi de la tesi.

4.4 CAPÍTOL IV: AVALUACIÓ DEL DANY PULMONAR DESPRÉS DE LA ISQUÈMIA CEREBRAL EN RATOLINS

4.4.1 Avaluació de les alteracions al BALF després de la isquèmia cerebral

Per tal d'estudiar l'efecte de l'ictus al pulmó, es van avaluar les possibles alteracions al BALF causades per la isquèmia cerebral. Per aquest motiu, es van comparar els nivells de concentració de proteïna al BALF entre els animals sotmesos MCAO i els animals *sham*. Es va observar una elevació de la concentració de proteïna en el grup dels ratolins sotmesos a MCAO respecte als animals *sham* (275.7 (IQR: 218.4-400.6) µg/mL vs. 215.8 (174.6-266.1) µg/mL), $p=0.009$, $N=42$ vs 11) (**figura 16A**). Amb aquests resultats, es va voler estudiar si hi havia una relació entre la quantitat de proteïna en el BALF i la severitat de la isquèmia. Per això, es va correlacionar la concentració de proteïna amb el volum d'infart en mm³ en els animals isquèmics. No obstant, no es va trobar cap tipus de correlació entre aquestes dues variables (**figura 16B**).

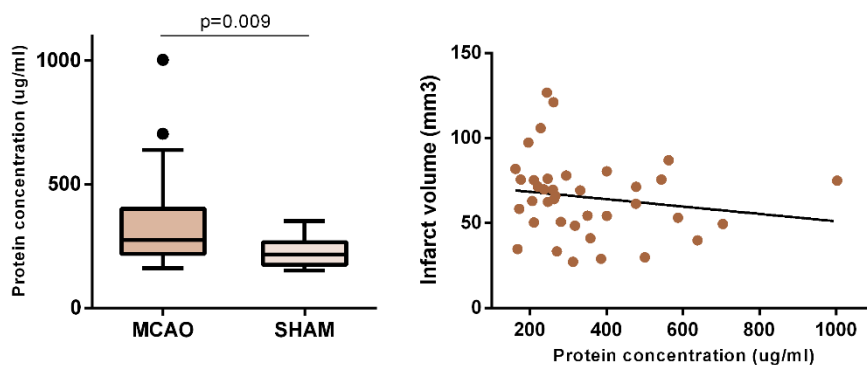


Figura 16. Quantificació de la concentració de proteïna en el BALF. (A) Boxplot comparant la concentració de proteïna en BALF de ratolins isquèmics vs la dels ratolins *sham* ($N=53$) (B) Gràfic de punts on es representa la concentració de proteïna en BALF a l'eix de les X i el volum d'infart a l'eix de les Y dels ratolins isquèmics ($N=42$).

Donats els resultats anteriors, es va decidir caracteritzar l'expressió proteica en el BALF per tal de detectar quines podrien ser les alteracions moleculars que es podrien estar donant a causa de la isquèmia. Es va fer servir el panell *Mouse Exploratory Panel* d'Olink[®] per tal de mesurar de manera simultània l'expressió de 92 proteïnes. De les 92 proteïnes, després del filtrat es inclouren 49 a l'anàlisi final, i d'aquestes, 12 van resultar significatives ($FDR < 0.1$). Totes les proteïnes diferencialment expressades es trobaven sobreexpressades en els animals isquèmics. Les 3 proteïnes més diferencialment expressades van ser el factor de creixement d'hepatòcits (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*; codi Uniprot: Q08048), la quinasa NAD (NADK, *NAD kinase*; codi Uniprot: P58058) i l'inhibidor de proteïna fosfatasa 2 (PPP1R2, *protein phosphatase inhibitor 2*;

codi Uniprot: Q9DCL8). A la **taula 17** es representen els log Fold Changes (logFC) i els p-valors de les proteïnes diferencialment expressades i es pot observar de manera gràfica a la **figura 17**.

Proteïna	logFC	p-value	FDR	Codi Uniprot
HGF	0.740	0.000	0.002	Q08048
NADK	1.237	0.000	0.002	P58058
PPP1R2	0.873	0.000	0.005	Q9DCL8
CASP3	1.209	0.000	0.005	P70677
CYR61	0.767	0.001	0.006	P18406
GDNF	0.609	0.001	0.006	P48540
FAS	0.524	0.001	0.006	P25446
ITGB6	0.573	0.002	0.015	Q9Z0T9
PRDX5	0.897	0.007	0.030	P99029
SNAP29	1.007	0.007	0.030	Q9ERB0
QDPR	0.634	0.007	0.030	Q8BVI4
LGMN	0.554	0.007	0.030	O89017

Taula 17. Top table de l'expressió de proteïna al BALF. Es mostren aquelles proteïnes significatives amb un FDR<0.1. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

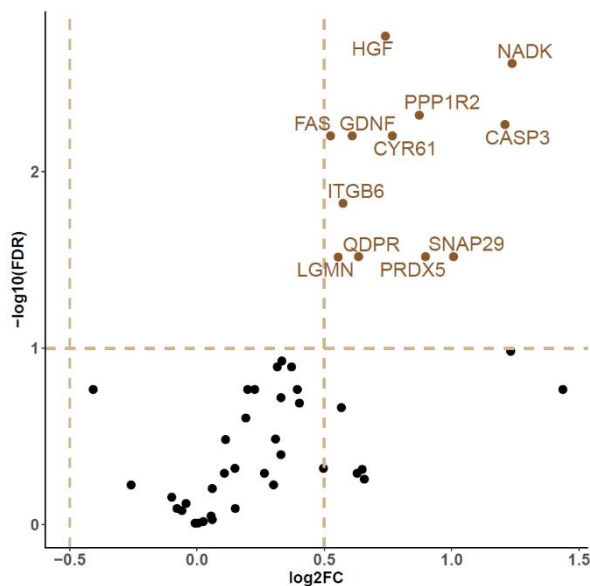


Figura 17. Volcano plot de les proteïnes significatives en l'anàlisi de BALF dels animals isquèemics vs shams. A l'eix de les X trobem el logFC i a l'eix de les Y trobem el $-\log_{10}$ de l'FDR. La línia horitzontal marca un FDR<0.1 i les línies verticals marquen un FDR > |0.5| (N=53).

Es va triar la proteïna més significativa, l'HGF, per tal de verificar els resultats obtinguts per una altra tècnica en les mateixes mostres. Es va quantificar la proteïna per ELISA, i es va observar un augment de HGF en el BALF dels ratolins isquèmics respecte als *shams* (2541.3 (2051.35-3491.26) vs 1887.31 (1283.22-2496.97) pg/mL, $p=0.021$) (**figura 18A**), d'igual manera als resultats obtinguts al panell d'Olink[®]. La correlació entre les dues tècniques va resultar positiva, amb un coeficient de correlació de 0.56 ($p<0.0001$) (**figura 18B**).

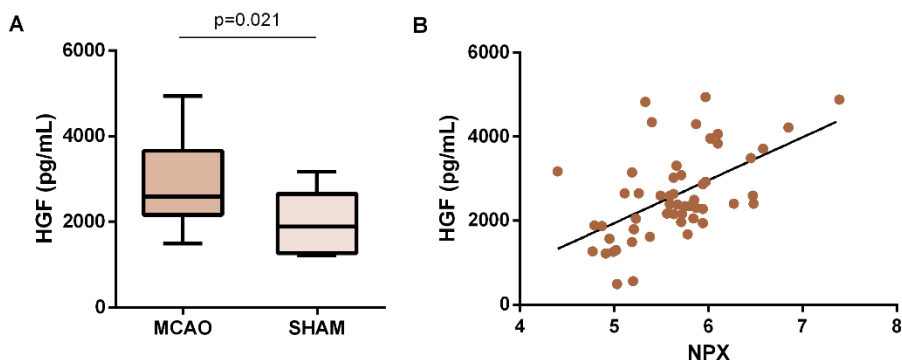


Figura 18. Mesura d'HGF per ELISA. (A) Boxplot comparant els nivells de HGF en BALF de ratolins MCAO vs ratolins *sham* (N=49) (B) Gràfic de punts on es representa la mesura d'HGF pel panell d'Olink[®] (eix X) i la mesura per ELISA (eix Y) (N=53).

4.4.2 Caracterització de l'expressió proteica de pulmó

També es va voler estudiar l'expressió de les mateixes proteïnes en homogenats de pulmó, per veure si algunes de les proteïnes diferencialment expressades en el BALF dels ratolins sotmesos a MCAO podrien estar-ho també en els pulmons, així com per detectar altres molècules alterades en el pulmó per la isquèmia. Per aquest anàlisi es van utilitzar els pulmons de 30 dels animals de l'estudi del BALF (24 MCAO i 6 *sham*).

Els resultats obtinguts van ser 14 proteïnes diferencialment expressades de 75 que es van incloure a l'anàlisi final. 3 d'aquestes es van trobar infraexpressades en els ratolins MCAO, i la resta (10) sobreexpressades. En aquest cas, les proteïnes més significatives van resultar ser el factor de creixement transformant α (TGF- α , *Transforming Growth Factor- α* ; codi Uniprot: P48030) en la seva proforma, la citoquina CCL2 (codi Uniprot: P10148) i la Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDH1; codi Uniprot: Q9CWS0). A la **taula 18** es representen els logFC i els p-valors de les proteïnes diferencialment expressades i es pot observar de manera gràfica a la **figura 19**.

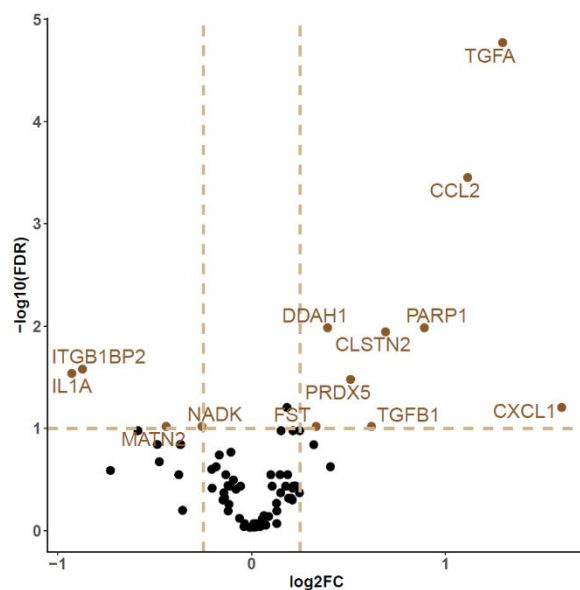
Resultats

De totes les proteïnes significatives, només es van trobar 2 proteïnes comuns en les dues comparacions, tant en la de BALF com en la de pulmó. Aquestes són la NADK i la Peroxiredoxin-5 mitocondrial (PRDX5). La NADK es troba sobreexpressada en els BALF dels ratolins isquèmics i infraexpressada en el pulmó, mentre que la PRDX5 es troba sobreexpressada en els ratolins isquèmics en els dos casos.

Proteïna	logFC	p-value	FDR	Codi Uniprot
TGFA	1.296	0.000	0.000	P48030
CCL2	1.115	0.000	0.000	P10148
DDAH1	0.392	0.001	0.010	Q9CWS0
PARP1	0.891	0.001	0.010	P11103
CLSTN2	0.691	0.001	0.011	Q9ER65
ITGB1BP2	-0.873	0.002	0.026	Q9R000
IL1A	-0.928	0.003	0.029	P01582
PRDX5	0.510	0.004	0.033	P99029
ADAM23	0.182	0.008	0.063	Q9R1V7
CXCL1	1.600	0.008	0.063	P12850
FST	0.333	0.015	0.096	P47931
MATN2	-0.441	0.017	0.096	O08746
NADK	-0.256	0.017	0.096	P58058
TGFB1	0.618	0.018	0.096	P04202

Taula 18. Top table de l'expressió de proteïna al pulmó. Es mostren aquelles proteïnes significatives amb un FDR<0.1. La columna p-value correspon al p-valor sense ajustar per comparacions múltiples.

Figura 19. Volcano plot de les proteïnes significatives en l'anàlisi de pulmó dels animals isquèmics vs *shams*. A l'eix de les X trobem el logFC i a l'eix de les Y trobem el $-\log_{10}$ de l'FDR. La línia horitzontal marca un FDR<0.1 i les línies verticals marquen un FDR > | 0.25 | (N=30).



Del llistat de proteïnes significatives, es van triar les dues primeres (TGF- α i CCL2) per a ser verificades per una tècnica alternativa (ELISA) en les mateixes mostres. Amb respecte a CCL2, es va trobar un augment d'aquesta proteïna en els animals isquèmics comparats amb els *sham*, tot i que no arriba a ser significativa (2487 (\pm 508.4) vs 2145 (\pm 459.5) pg/ml, $p=0.14$) (**figura 20A**). També es va observar una correlació positiva entre la detecció de la molècula per ELISA i per Olink[®], amb un coeficient de correlació de 0.66 ($p<0.0001$) (**figura 20B**).

Pel que fa a TGF- α , cal destacar que el panell d'Olink[®] detecta la proTGF- α , mentre que els ELISAs comercials estan dissenyats per a mesurar la forma madura de TGF- α . Per aquest motiu, la correlació que trobem entre els valors obtinguts en les dues tècniques és negativa ($R=-0.42$, $p=0.02$) (**figura 20D**). Després de l'anàlisi per ELISA d'aquestes mostres, es va trobar valors més baixos en els ratolins isquèmics respecte als *shams* (1833 (\pm 393.2) vs 2323 (\pm 322.8) pg/ml, $p=0.009$) (**figura 20C**).

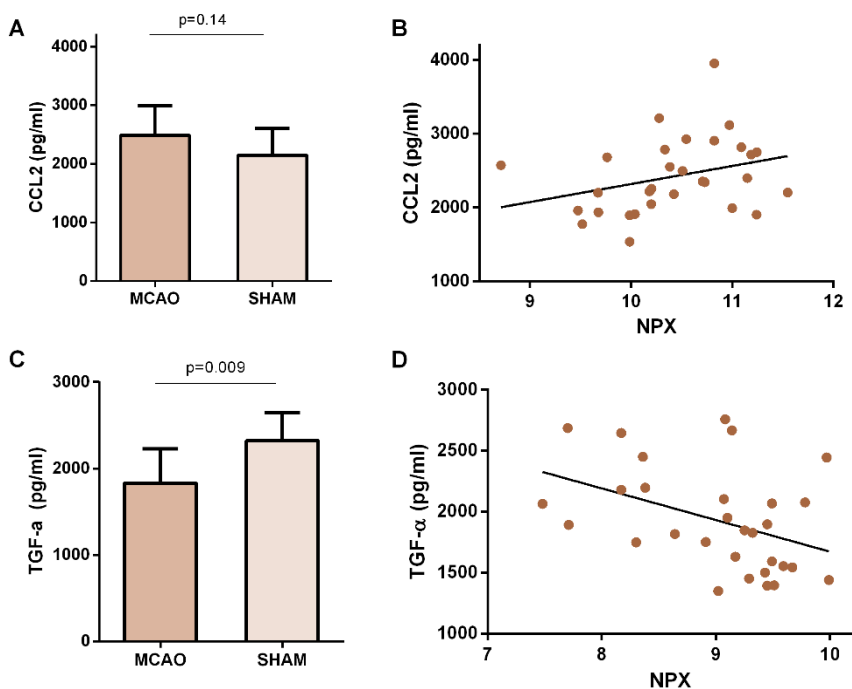


Figura 20. Mesura de CCL2 i TGF- α per ELISA. (A) Boxplot comparant els nivells de CCL2 en pulmó de ratolins MCAO vs ratolins *sham* (N=30) (B) Gràfic de punts on es representa la mesura de CCL2 pel panell d'Olink[®] (eix X) i la mesura per ELISA (eix Y) (N=30). (C) Boxplot comparant els nivells de TGF- α en pulmó de ratolins MCAO vs ratolins *sham* (N=30) (D) Gràfic de punts on es representa la mesura de TGF- α pel panell d'Olink[®] (eix X) i la mesura per ELISA (eix Y) (N=30).

4.4.3 Avaluació de la permeabilitat alveolo-capil·lar

Per altra banda, es va voler estudiar si l'increment de la concentració de proteïna al BALF està causada per un augment de la permeabilitat epitelial als pulmons dels animals isquèmics. Així doncs, es va realitzar un estudi de la permeabilitat alveolo-capil·lar. Després de la injecció de FITC-dextrà a 7 animals sotmesos a MCAO i 5 animals *sham*, es va estudiar la ràtio entre la fluorescència del BALF i la fluorescència del sèrum. No es van observar diferències entre les ràtios dels dos grups. A més, també es va estudiar la quantitat de FITC-dextrà que hauria penetrat al pulmó, i no es van trobar diferències entre els animals sotmesos MCAO i els *shams*, després d'ajustar la fluorescència del pulmó pel pes de cadascun dels teixits.

5. DISCUSSIÓ

Aquesta tesi doctoral ha constatat de 4 estudis diferents, els resultats dels quals s'han presentat en 4 capítols a la secció de Resultats. La intenció d'aquesta tesi ha estat abordar la SAP des de diferents aproximacions, tant emprant diferents estratègies per al descobriment de nous biomarcadors com examinant l'efecte local de l'ictus en el pulmó per estudiar el seu possible rol en la susceptibilitat dels pacients amb ictus de desenvolupar SAP. Per aquest motiu, aquesta discussió també es dividirà en 4 apartats, per tal de tractar cada estudi per separat i poder discutir-lo en profunditat, i finalitzarà en una discussió global de tots els resultats en conjunt.

5.1 MR-proADM, CRP i SAA per a la predicció de la SAP

En el primer capítol d'aquesta tesi, hem realitzat un estudi multicèntric prospectiu on hem observat que SAA, CRP i MR-proADM semblen ser 3 de les molècules més associades amb l'aparició de la SAP, i que la combinació de les 3 en un panell podria ser capaç de predir i/o diagnosticar la SAP amb una alta sensibilitat.

Tal i com s'ha comentat al llarg d'aquesta tesi, la identificació de biomarcadors predictors de la SAP és una necessitat clínica que podria fer millorar el pronòstic dels pacients que la pateixen. S'han estudiat múltiples biomarcadors per aquest *endpoint*, alguns dels quals s'inclouen a l'apartat 1.4.1. A més, una revisió bibliogràfica àmplia en aquest camp s'ha publicat recentment [24]. Degut a l'alta quantitat de molècules estudiades, es va decidir dividir l'estudi en dues fases. En una primera fase, es va realitzar un anàlisi *interim* on es van mesurar 6 dels biomarcadors seleccionats per bibliografia prèvia. Amb els resultats obtinguts, es van triar aquells que es van trobar associats a la SAP, que van ser CRP, MR-proADM i SAA, per tal de ser mesurats a la cohort completa de pacients.

Aquests 3 biomarcadors han estat avaluats en dues finestres temporals diferents: una en les primeres 24 hores després de l'ictus, per tal de poder predir l'aparició de la SAP; i una altra entre les 24 i les 48 hores després, per estudiar el poder dels biomarcadors com a eina de diagnòstic precoç. El temps en el que s'avalua el biomarcador és clau en aquest àmbit. El terme SAP engloba aquelles infeccions respiratòries de tracte baix que es desenvolupen en els primers 7 dies després de l'ictus [53]. No obstant, en el nostre estudi hem observat que més del 70% dels pacients que desenvolupen SAP ho fan en els primers 3 dies després de l'aparició dels símptomes de l'ictus, i el 27% en les primeres 24 hores. Per tant, una mesura dels biomarcadors més tard de les primeres 48h no seria molt útil ni per a la predicció ni per al diagnòstic de la SAP.

Els 3 biomarcadors seleccionats per mesurar a la cohort completa han resultat estar associats amb l'aparició de SAP. MR-proADM és la versió circulant més estable i més fàcilment detectable de la proteïna ADM, que té una vida mitja circulant molt curta. Es tracta d'un vasodilatador que juga un paper important en els processos inflamatoris, i ha estat àmpliament descrit com a biomarcador de sepsis [117]. La bibliografia prèvia també apunta aquesta proteïna com a un bon predictor de SAP i SAI [87,118], i tot i que en el nostre estudi l'hem trobat associada a la SAP en els dos punts temporals estudiats, no hem observat que per si sola tingui una capacitat predictiva suficient després d'ajustar per un model clínic. Pel que fa a SAA i CRP, es tracta de dues proteïnes de fase aguda. CRP s'ha relacionat àmpliament amb la SAP [119], i SAA es va descobrir en l'àmbit més recentment, tot i que ja s'ha validat en diversos estudis com a possible predictor de SAIs [84,118,120]. La funció biològica d'aquestes dues molècules és similar, d'aquí a que les trobem correlacionades en el nostre estudi, tot i que SAA sembla estar incrementada en les infeccions bacterianes i víriques, contràriament al que passa amb CRP, on el seu augment en les infeccions víriques és bastant menor al que s'observa en les infeccions bacterianes [121]. Això fa que ambdues puguin ser complementàries en la predicció de la SAP, ja que tot i que la etiologia microbiana d'aquestes infeccions apunti a ser bacteriana [68], tal i com s'ha comentat en el punt 1.3.2.3 d'aquesta tesi, la caracterització és complicada i no podem descartar que l'etiologia subjacent en alguns casos de SAP no pugui tenir un origen víric.

Aquest podria ser un dels motius pels quals l'eina PanelomiX inclou ambdues proteïnes al panell seleccionat, juntament amb MR-proADM, el qual ha estat ajustat per tal d'obtenir la màxima precisió. Aquests panells resulten altament sensibles i específics, sobretot entre les 24 i les 48h després de l'íctus, i podrien ser emprats en la pràctica clínica per guiar l'antibioteràpia en aquells casos en els que podria haver sospita de SAP. Un altre punt fort d'aquests marcadors és que tots ells estan posats a punt per ser avaluats als laboratoris assistencials. De fet, l'assaig B.R.A.H.M.S Kryptor per a MR-proADM ja fa diversos anys que es va validar com un assaig ràpid automatitzat [122]. A més, en el cas de SAA i CRP es disposa de dispositius de diagnòstic immediat (POCT, *point-of-care testing*) al mercat, o de prototips que s'estan desenvolupant [123,124].

Tot i que l'AUC de les corbes ROC augmenta quan al model clínic se li afegeix el panell de biomarcadors seleccionat, aquesta diferència no és notòria, fent plantejar el cost-benefici d'aquests panells. Això deixa en evidència la necessitat de descobrir nous biomarcadors predictors de SAP, tal i com s'ha estudiat en altres capítols d'aquesta tesi. Esforços futurs haurien de centrar-se en dissenyar nous estudis amb la intenció

d'explorar nous candidats per a la predicció de la SAP, ja que tot apunta a que els que s'estan estudiant actualment podrien no tenir prou capacitat predictora al ser afegits a models clínics.

Per altra banda, l'aparició primerenca de la SAP fa que la tria de les finestres temporals per a l'avaluació de la capacitat predictora o diagnòstica d'aquesta es compliqui, ja que segons quan s'extregui la mostra sanguínia, podria ser que el pacient ja ha desenvolupat clínica de SAP i ja se li ha administrat teràpia antibiòtica. No obstant, la SIIS no succeeix a la fase híper aguda de l'ictus si no més aviat a la subaguda, així que una determinació massa primerenca dels biomarcadors podria tampoc ser capaç de detectar els pacients amb un alt risc de desenvolupar SAP.

Les limitacions d'aquest estudi es comenten a continuació. En primer lloc, i un fet a destacar és que per diversos motius no s'ha pogut arribar a la mida mostral estimada, perdent potència estadística. La freqüència de SAP en el nostre estudi ha estat d'un 7.6% dels pacients, un percentatge a la part baixa del rang observat en estudis anteriors [44]. Això és probablement degut a que la major part dels nostres centres disposen d'unitats d'ictus i apliquen la trombectomia mecànica, permetent un molt millor pronòstic del pacient. Això fa que es necessiti una mida mostral elevada per tal de tenir un nombre de casos suficient per a assolir potència estadística. Per una altra banda, aquests resultats suposen una actualització de la incidència de SAP i altres infeccions en les unitats d'ictus avui en dia. A més, l'ús de punts de tall en les combinacions de biomarcadors, encara que hagin estat seleccionats automàticament pel software PanelomiX, pot estar sobreestimant la precisió de les nostres observacions, i no s'ha pogut realitzar cap mena de validació interna (tipus validació creuada) degut a la baixa mida mostral. Per últim, encara no s'han pogut realitzar per al moment anàlisis que incloquin ratis de comptatges cel·lulars, una eina fàcil de mesurar i que podria complementar els models clínic elaborats. Aquestes dades s'inclouran en futurs anàlisis d'aquestes dades.

5.2 Estudi de subpoblacions leucocitàries per a la identificació de nous biomarcadors per a la SAP

En el capítol II de la secció de Resultats d'aquesta tesi doctoral, hem vist que els neutròfils semblen ser el tipus cel·lular que més alteracions d'expressió gènica i proteica pateix en aquells pacients amb ictus que desenvolupen SAP. A més, s'han seleccionat i validat alguns candidats interessats que han de ser explorats en una cohort més gran de pacients.

Les estratègies de descobriment de nous biomarcadors s'han centrat en els últims anys en l'ús de tècniques -òmiques, que permeten fer un cribatge massiu als diferents nivells moleculars. En l'ictus, aquestes eines s'han emprat per al descobriment de nous biomarcadors per al diagnòstic de la malaltia i per a la identificació de la etiologia, entre d'altres [125].

Per aquest motiu, hem volgut aplicar aquestes tècniques per al descobriment de nous biomarcadors per a la SAP, degut la necessitat d'aquests en la pràctica clínica, tal i com s'ha fet palesa al llarg d'aquesta tesi. El nostre és el primer estudi de descobriment a gran escala en aquest àmbit. Les alteracions moleculars que és donen en el sistema immunològic després de la isquèmia que afavoreixen una immunosupressió sistèmica, portant a una major susceptibilitat dels pacients a patir infeccions, tal i com s'ha comentat anteriorment. Per aquest estudi, hem volgut aplicar les tècniques -òmiques per al descobriment de nous biomarcadors per a la SAP en les 3 principals subpoblacions leucocitàries (limfòcits, monòcits i neutròfils), per tal de descobrir alteracions en aquestes cèl·lules que ens permetessin identificar els pacients amb alt risc a patir SAP.

A la pràctica clínica, un biomarcador sanguini seria l'eina més ràpida per a la mesura d'una molècula, ja que fins i tot es podria mesurar a la pròpia unitat d'ictus gràcies a dispositius POCT [126]. Per aquest motiu, també es va incloure en l'anàlisi de transcriptòmica l'estudi de l'RNA total. L'anàlisi proteòmic del plasma no es va realitzar degut a les limitacions tècniques de la MS en la detecció de pèptids a poca concentració en aquest fluid biològic [127]. Tot i així, un biomarcador alterat en un tipus cel·lular avui en dia també ens seria útil en l'àmbit clínic, gràcies a l'avenç de la citometria de flux i a les tècniques microfluídiques per a l'aïllament cel·lular [128]. A més, cal tenir en compte que la mesura de biomarcadors per a la SAP hauria de ser en la fase aguda de l'ictus, però no seria estrictament necessari que fos a l'ingrés. Aquest fet ampliaria en unes hores la finestra temporal i permetria realitzar tècniques d'aïllament cel·lular i la posterior quantificació de l'expressió d'algun marcador.

Amb respecte als resultats obtinguts, podem afirmar que el tipus cel·lular circulant que més alteracions pateix a nivell d'expressió degut a l'ictus són els neutròfils. Aquestes cèl·lules circulants augmenten en nombre en les 24 hores després de l'ictus [129], i també s'ha vist que pateixen alteracions en les seves funcions després de la isquèmia, associades a aquells pacients que desenvolupen infeccions. Més concretament, van Gemmeren et al. [35] van observar una reducció de la producció de ROS en els pacients que van desenvolupar infeccions. Aquesta reducció es va observar el primer dia després

de l'ictus, i és independent a factors de risc associats a les infeccions. En aquest estudi, però, no van trobar una alteració en l'esclat oxidatiu, fet que sí es va observar en l'estudi realitzat per Ruhnau et al. [34], on també es va observar una disminució de la funció de NETosis en aquestes cèl·lules. Aquests estudis van en la nostra línia, i apunten a una alteració en l'expressió gènica i proteica dels neutròfils circulants, a part d'una alteració ens les seves funcions de protecció immunològica en els pacients que posteriorment desenvolupen infeccions, i en concret SAP. Aquest fet obre portes a un possible estudi d'aquesta subpoblació cel·lular com a diana terapèutica per a teràpies immunomoduladores preventives de la SAP.

Després de l'anàlisi -òmic, s'han seleccionat uns quants candidats per tal de mesurar-ne la seva expressió en una mida mostral més gran i emprant una tècnica més sensible. Contràriament a l'esperat, els gens seleccionats al grup dels limfòcits han estat els que s'han mantingut significatius en els nous pacients. Un exemple és el gen *S100A8*, que codifica per una proteïna homònima que forma heterodímers amb *S100A9*. El seu rol durant la inflamació està relacionat amb el reclutament de leucòcits i la secreció de citocines [130]. A més, s'ha estudiat com a biomarcador en malalties inflamatòries [131,132]. Malauradament, l'expressió dels gens diferencialment expressats en els neutròfils dels pacients amb SAP no s'ha pogut detectar amb la tècnica emprada. A priori, no hem estat capaços de trobar una raó per aquest fet, ja que els 3 gens triats s'expressen en els neutròfils i van ser detectats per la tècnica de microarrays a la fase de descobriment. De fet, les sondes TaqMan emprades en la fase de qualificació són les mateixes que les que es troben als microarrays per aquests gens.

A nivell proteic, només es van seleccionar per a la següent fase les proteïnes diferencialment expressades als neutròfils, ja que en els altres grups cel·lulars no hi havia cap proteïna suficientment alterada com per ser seleccionada. El baix nombre de molècules diferencialment expressades en el cas de les cèl·lules CD3+ i CD14+ ha condicionat sens dubte aquesta fase de l'estudi, ja que només ens ha permès estudiar en profunditat l'expressió dels candidats obtinguts en les cèl·lules CD16+ en el cas de l'anàlisi proteic. En aquest cas, només hem pogut detectar una de les 3 proteïnes seleccionades, YKL-40, i en la qual no hem observat en la fase de qualificació les diferències que sí es van veure a la fase de descobriment. Es podrien provar anticossos de cases comercials alteratives per tal d'estudiar l'expressió de VCP i de PGRP-S en els pacients de la fase de qualificació.

Els motius pels quals no hem estat capaços de observar les mateixes diferències en les fases de descobriment i qualificació en aquesta subpoblació leucocitària semblen ser més aviat tècnics. Per aquest motiu, es podrien emprar altres tècniques alternatives per a la quantificació de l'expressió gènica i proteica. En el cas de l'expressió gènica, en aquest estudi s'ha utilitzat la tècnica qPCR mitjançant sondes TaqMan, però sembla que no és una tècnica adient per als gens seleccionats. Una alternativa podria ser l'ús de NanoString, una tecnologia que permet mesurar de manera simultània l'expressió de varis gens a través de l'ús d'una tecnologia basada en un codi de barres digital colorimètric [133]. Per altra banda, una alternativa a l'ús del Western Blot per a la quantificació proteica seria la tècnica ELISA, tot i que la baixa quantitat de mostra disponible, així com de concentració proteica en algunes de les mostres, la fa una tècnica no tan adequada per a les nostres necessitats. L'una altra opció alternativa seria mesurar directament aquestes proteïnes en plasma o sèrum, tot i que correriem el risc de que les diferències es veiessin emmascarades en aquests fluids i no fóssim capaços d'observar-les.

Amb aquests resultats, podem afirmar que amb aquest estudi, en la fase actual, no hem estat capaços de descobrir nous biomarcadors candidats per a la SAP. Tot i així, hem identificat el grup dels neutròfils com el tipus cel·lular circulant que pateix més alteracions a nivell d'expressió d'entre les 3 principals subpoblacions leucocitàries, posant-los en el punt de mira com el grup a estudiar en profunditat per a seguir elucidant els processos biològics que es donen a nivell sistèmic associats a la SIRS. A més, amb les dades generades en aquest estudi, conjuntament amb altres tipus de dades es podrien construir models virtuals *in-silico* mitjançant la biologia de sistemes [134].

En aquest estudi trobem algunes limitacions i motius per als quals podem no haver obtingut els resultats esperats. En primer lloc, cal parlar de la tècnica emprada per a l'aïllament cel·lular. La MACS es tracta d'una tecnologia per mitjà de la qual ens permet aïllar diferents poblacions cel·lular a partir de sang completa, gràcies a l'ús de *beads* magnètiques unides a anticossos específics per a la població d'interès a aïllar. Aquesta tècnica i la disponibilitat del seu equip ens permetia poder aïllar la major quantitat possible de cèl·lules a demanda, tot i que la seva principal limitació era el temps necessari per poder aïllar les 3 subpoblacions del nostre interès, que feia que necessitéssim un mínim de 6 hores per a realitzar el protocol sencer. La principal conseqüència d'aquest fet és que ens vam veure obligats a triar les 24 i les 48 hores després de la isquèmia com a finestra temporal, per a poder tenir temps suficient per a completar l'aïllament cel·lular.

En segon lloc, la mida mostral és un altre punt a destacar. Les tècniques –òmiques, tot i que cada vegada s'hi estan fent més avenços que permeten abaratir els costos, segueixen sent unes tècniques d'alt cost econòmic. Això limita la mida mostral dels estudis de descobriment, i més en el nostre estudi, en el qual teníem 3 supoblacions a estudiar. Aquesta limitació també és important en la fase de qualificació, ja que al ser la taxa de SAP d'un 7-8% en els pacients amb ictus, s'han hagut d'incloure i realitzar l'aïllament cel·lular en més de 100 pacients per acabar tenint els 22 seleccionats en aquesta fase.

Els propers passos en aquest estudi podrien ser, tal i com s'ha exposat amb anterioritat, mesurar els gens i proteïnes seleccionats en la fase de qualificació a nivell sèric o plasmàtic. Cap la possibilitat que en sang circulant no s'observin aquestes diferències, però caldria comprovar-ho, ja que, si fos possible, facilitaria la mesura del biomarcador a la pràctica clínica. Per altra banda, també es podria emprar la tècnica de la separació cel·lular fluorescent (FACS, *Fluorescent Activated Cell Sorting*), tot i que això suposaria la mesura de la molècula en unes poques hores després de l'extracció sanguínia.

5.3 Biomarcadors sanguinis per a la predicció de complicacions associades a l'ictus a l'ingrés

En el capítol III hem demostrat, mitjançant un anàlisi retrospectiu, que el desenvolupament de 2 de les complicacions més comuns després de l'ictus durant l'hospitalització podrien ser predites a l'ingrés mitjançant l'ús de 2 panells de biomarcadors diferents en combinació amb variables clíniques. L'estratègia seguida en aquest estudi podria ser una alternativa per al descobriment de biomarcadors per a indicacions diferents a les plantejades inicialment.

L'ús de biomarcadors sanguinis per a la predicció de complicacions post-ictus ha generat un interès creixent en els últims anys [135,118]. No obstant, fins a la data, els marcadors individuals no han demostrat prou poder predictiu com per ser implementats a la pràctica clínica. L'aproximació emprada en aquest estudi ha estat, enlloc d'estudiar els marcadors individualment, avaluar els biomarcadors en conjunt mitjançant la creació de panells. Aquests biomarcadors podrien ser complementaris i podrien millorar la predicció de la complicació en concret [136]. Els panells de biomarcadors podrien ser més útils ja que podrien reflectir millor la complexitat de les malalties i les seves conseqüències, en les que hi ha molts processos biològics implicats i alterats. De fet, hem obtingut dos panells de biomarcadors amb marcadors individuals de diverses vies implicades en l'ictus i en les complicacions post ictus.

Dels biomarcadors proposats per a la predicció de ADHF després de l'ictus, NT-proBNP ha estat àmpliament associat amb el diagnòs de ADHF [137]. La proteïna VAP-1 és un marcador de disfunció endotelial, i s'ha relacionat amb HF congestiva, essent més alta en els pacients amb HF comparat amb els controls [138]. També s'ha descobert com a marcador de pronòstic de mortalitat en pacients amb HF crònica [139]. L'últim marcador del panell és D-dímer, un producte de la degradació de la fibrina. En pacients sans, nivells alts de D-dímer s'han associat amb HF incident amb fracció d'ejecció reduïda [140]. A més, en pacients amb HF coneguda, s'ha vist que els nivells més alts de D-dímer prediuen la mortalitat i la incidència de FA [141].

Les proteïnes del panell predictor de RTIs estan més relacionades amb la fase aguda. L'increment de la citoquina pro-inflamatòria IL-6 en pacients amb SAP s'ha reportat en múltiples estudis, presentant la seva capacitat de predir el risc de SAIs i la mortalitat [66,142,143]. Respecte a les altres dos proteïnes del panell, D-dímer s'ha associat amb CAP. Nivells alts plasmàtics d'aquesta molècula es van correlacionar amb la gravetat de la malaltia [144]. Pel que fa a vWF, és la única proteïna que no ha estat relacionada amb RTIs en bibliografia prèvia. Les seves principals funcions biològiques estan relacionades amb l'adhesió de les plaquetes i la protecció del factor VII [145]. Tanmateix, s'han descobert noves funcions d'aquesta proteïna en els últims anys, reportant-se interaccions entre plaquetes i infeccions bacterianes [146] i també un rol de vWF en les cèl·lules immunitàries, més concretament en l'extravasació leucocitària, entre d'altres [147].

Els nostres resultats, de ser confirmats, poden tenir implicacions clíniques. En aquest estudi, el que proposem són 2 panells de biomarcadors diferents que podrien predir a l'ingrés l'aparició de ADHF o RTIs després de l'ictus. Els dos panells tenen alta sensibilitat, resultant en una detecció de la majoria dels vertaders positius. La predicció d'aquestes dues complicacions permetria monitoritzar als pacients detectats pel panell i tractar-los el més aviat possible. Aquesta alta sensibilitat dels panells, en el cas de les RTIs en concret, potser podria permetre no administrar antibiòtics als pacients amb símptomes inespecífics.

La dispnea és un símptoma comú entre l'ADHF i les RTIs, i això de vegades pot retardar el diagnòstic de la complicació. Degut als resultats obtinguts en aquest estudi, suggerim que les dues combinacions de biomarcadors descobertes podrien també ser útils en la diferenciació d'ambdós complicacions, i els clínics tindrien eines addicionals per a un diagnòstic i un tractament precoços. No obstant, per tal de confirmar aquesta hipòtesi,

s'hauria de realitzar un estudi prospectiu mesurant aquests biomarcadors en pacients amb dispnea.

Aquest estudi té certes limitacions. En primer lloc, algunes de les dades es van recollir per revisió dels registres clínics, i això suposa tenir dades perdudes. De fet, la incidència de ADHF és molt més baixa que la reportada prèviament. En segon lloc, el baix nombre de casos de ADHF comporta uns CI amplis (tot i emprar la correcció de Firth en els models de regressió logística) per a la combinació de biomarcadors, fent els nostres resultats menys fiables. Per altra banda, no disposem de les dades relacionades amb la història prèvia de HF, així que no podem descartar que el valor predictor del panell podria estar modificat per la HF prèvia. Altres dades rellevants pel que fa a les RTIs tampoc estan disponibles en aquest estudi, com és la disfàgia. La validació externa dels nostres resultats no s'ha pogut dur a terme degut a la no disponibilitat d'una cohort de pacients gran amb mostres de sang en fase aguda. A més, l'ús de punts de tall en les combinacions de biomarcadors, encara que hagin estat seleccionats automàticament pel software PanelomiX, pot estar sobreestimant la precisió de les nostres observacions. No obstant, donada la naturalesa preliminar d'aquest estudi, els punts de tall seleccionats poden servir com una referència per a possibles replicacions en nous estudis. Per últim, els biomarcadors mesurats van ser seleccionats per altres *endpoints*; així doncs, els nostres panells podrien ser millorants utilitzant altres biomarcadors més relacionats amb el nostre *endpoint*, com CRP [83], procalcitonina [86] o SAA [84] per les RTIs, o *midregional proatrial natriuretic peptide*, IL-1 *receptor-like 1* o galectin-3 per a ADHF [137].

Aquestes limitacions, i el fet que l'estudi original del que provenen els biomarcadors mesurats estava dissenyat per una altra indicació, fan que el nostre estudi sigui un estudi generador d'hipòtesis, i es necessiten estudis futurs per tal d'establir la utilitat clínica dels panells de biomarcadors descoberts. Aquests futurs estudis prospectius haurien d'incloure pacients amb ictus, en els quals se'ls recollissin dades de símptomes respiratoris i cardíacs, i, idealment, es poguessin realitzar mesures seriades dels panells de biomarcadors en tots els pacients, per tal de determinar l'especificitat i la sensibilitat de cada combinació per a la predicció entre complicacions. La dispnea s'hauria de reportar, per tal d'explorar la capacitat de les combinacions de diferenciar entre les dues complicacions en els pacients inclosos.

5.4 Implicació de les alteracions pulmonars després de la isquèmia cerebral en la SAP

En el capítol IV, hem demostrat a partir de l'increment de proteïna total en el BALF, que després de la isquèmia cerebral es dona un dany pulmonar. Segons els nostres resultats, aquest dany no estaria associat a una alteració en la permeabilitat de la barrera alveolo-capil·lar. A més, hem identificat i verificat HGF, TGF- α i CCL2 com a proteïnes alterades després de la isquèmia a nivell pulmonar.

L'aparició d'infeccions respiratòries que compliquen el pronòstic dels pacients no només es dona en l'ictus, si no també en altres malalties del sistema nerviós central com el TBI. De fet, la pneumònia és també una de les complicacions més comuns en els pacients amb TBI greu, amb una incidència al voltant del 30% [148]. Tal i com s'ha comentat a l'apartat 1.3 de la Introducció, la immunosupressió és un fet comú entre les dues malalties, així com l'aparició de complicacions pulmonars com la pneumònia, ALI o ARDS, posant de manifest el *cross-talk* que existeix entre el cervell i el pulmó.

Tot i que la interacció entre el cervell i el pulmó és ben coneguda, l'efecte de la isquèmia cerebral al pulmó no s'ha començat a estudiar fins recentment. En el nostre estudi, hem observat un increment de la concentració de proteïna en BALF a les 24 hores després de la isquèmia en els animals sotmesos a isquèmia cerebral quan els comparem amb els animals *sham*, essent aquest paràmetre un indicador de dany pulmonar. Aquests resultats van en línia amb els observats per Samary et al. [39], els quals, a part d'observar un increment en la proteïna total en BALF en les rates amb isquèmia focal, també van trobar alterats paràmetres ventilatoris com són el volum tidal i la freqüència respiratòria. Cal destacar que la mesura de tots aquests paràmetres també es va realitzar 24 hores després de la isquèmia.

No obstant, un altre estudi recent presenta uns resultats en contraposició amb els anteriors. En l'estudi publicat per Austin et al. [40], en el qual utilitzen el mateix model d'isquèmia cerebral (MCAO) en ratolins que en el nostre estudi, però amb un temps d'oclusió inferior (60 minuts), no van observar diferències en la concentració de proteïna en el BALF comparant animals isquèmics i animals *sham*. Tot i així, sí van observar un increment en el nombre total de cèl·lules en BALF, així com de macròfags i neutròfils. Així doncs, tot i que no veure alteració en el paràmetre mesurat per nosaltres, els resultats obtinguts sí van en la mateixa direcció, tot indicant que la isquèmia cerebral està causant un dany pulmonar als animals que la pateixen, i que aquest dany podria tenir implicacions clíniques relacionades amb patologies pulmonars.

Els motius per la discordança entre estudis pel que fa a la concentració de proteïna en BALF poden ser varis. Comparant el nostre estudi amb el realitzat per Austin et al., en el que s'ha utilitzat la mateixa espècie animal i el mateix model de isquèmia, podem veure que els temps d'isquèmia són diferents, ja que en l'estudi presentat a la tesi, el temps d'oclusió ha estat de 90 minuts, mentre que l'estudi ja publicat ha induït una isquèmia de 60 minuts. Tot i que aquesta diferència en el temps podria ser un dels motius de la discordança, a priori no sembla rellevant. Els temps d'isquèmia més alts provoquen volums d'infart majors, però observant els nostres resultats, no hem observat una correlació entre el volum d'infart i la concentració de proteïna en BALF.

A més, cal tenir en compte que, tot i que no hem avaluat el comptatge cel·lular en el BALF, la mida mostral del nostre estudi és molt superior. Per això, estudis futurs en aquest camp haurien de poder avaluar el màxim de paràmetres possibles per a l'avaluació del dany pulmonar en una mida mostral similar a la realitzada al nostre estudi, per tal d'acabar de confirmar l'alteració de tots els paràmetres després de la isquèmia.

Una de les hipòtesis del nostre estudi era que la permeabilitat de la barrera alveolo-capil·lar podria alterar-se i augmentar degut a la isquèmia cerebral, de manera similar al que succeeix amb la barrera intestinal [149]. L'epiteli alveolar és la barrera física que protegeix el pulmó d'agents externs, a part de ser un dels principals contribuents al manteniment de l'homeòstasi d'aquest òrgan. Aquesta barrera pot patir alteracions en patologies pulmonars com ARDS, ALI o COPD [150,151]. En el nostre cas, no hem observat una alteració en la permeabilitat de l'epiteli alveolar en els ratolins isquèmics envers els *sham*, mitjançant la injecció de FITC-dextrà i la posterior comparació entre els nivells de fluorescència de sèrum i BALF. Tot i així, es podria realitzar una confirmació d'aquests resultats mitjançant l'estudi de l'expressió de proteïnes pròpies de les unions estretes (en anglès *tight junctions*) com la família de les claudines o la occludina.

Per altra banda, en aquest estudi hem identificat 3 proteïnes amb una expressió alterada en els ratolins isquèmics comparat amb els no isquèmics. A més, aquesta expressió ha estat validada per dues tècniques diferents. La molècula HGF s'ha trobat sobreexpressada en el BALF dels ratolins isquèmics. Es tracta d'un factor de creixement produït per cèl·lules d'origen mesenquimal com fibroblasts i macròfags, la transducció de senyal de la qual activa una gran quantitat de processos biològics com són la migració, la proliferació i la morfogènesi cel·lular. En el pulmó, ha estat àmpliament reportat el seu rol en la reparació pulmonar [152]. De fet, s'ha reportat un increment dels nivells d'HGF en el BALF de pacients amb dany pulmonar, més concretament ARDS

[153]. Això va en línia amb els nostres resultats, i és un indicador més del dany pulmonar que pot estar causant la isquèmia cerebral. Altrament, en estudis anteriors en rata s'ha observat un augment de l'expressió gènica de HGF després de la inducció d'ALI, com a mecanisme compensatori d'aquest dany [154].

Pel que fa a la citocina CCL2, de la qual hem trobat nivells més alts d'aquesta en els homogenats de pulmó dels ratolins MCAO, és una molècula associada als processos inflamatoris, concretament amb un rol pro inflamatori al pulmó, tal i com van reportar van Zoelen et al. [155]. Farris et al [41], en un estudi en el que exploraven l'alteració del nínxol immunològic després de la isquèmia cerebral en ratolins, també van trobar aquesta citocina augmentada a les 24 hores després de la isquèmia, quan ho comparaven amb animals *sham*, però aquesta diferència desapareixia a les 72 hores després de la isquèmia.

Per últim, també hem estudiat l'expressió de TGF- α al pulmó. La forma precursora d'aquesta molècula, anomenada proTGF- α , la qual és tallada pels llocs N-terminal i C-terminal per a convertir-se en la forma madura [156]. Mitjançant la tècnica de PEA, el que s'ha detectat en les mostres dels ratolins és la proTGF- α , i s'han observat nivells més alts de la precursora en els ratolins isquèmics respecte als *sham*. Per contra, per la validació de la tècnica anterior hem emprat l'ELISA, el qual tots els kits comercials disponibles detecten la forma madura. El resultat ha estat el contrari que en el cas anterior, essent els ratolins *sham* els que tenen nivells més alts d'aquesta proteïna. A més, la correlació entre les dues tècniques ha resultat negativa, determinant una relació inversament proporcional. Aquests resultats podrien indicar que la isquèmia podria estar alterant el procés de maduració de TGF- α . Aquesta molècula és un lligand del *Epidermal Growth Factor receptor* (EGFR) i activa vies de senyalització per a la proliferació i diferenciació cel·lular, entre d'altres. Al pulmó, s'ha observat un increment de l'expressió del gen que codifica per TGF- α (*TGFA*) i de EGFR després de la inducció de lesió pulmonar per bleomicina en rates, així com un augment de la seva expressió proteica 4 dies després de l'insult [157]. Més tard, Hardie et al. van induir una lesió pulmonar a ratolins transgènics que expressaven TGF- α a diferents nivells, i van trobar en els animals amb els nivells més alts una atenuació de la resposta inflamatòria i una reducció de l'edema pulmonar, suggerint així un rol protector d'aquesta proteïna en el dany pulmonar [158,159].

La implicació clínica del dany pulmonar associat a la isquèmia cerebral està encara per determinar. La isquèmia cerebral provoca, a part del dany mencionat anteriorment, una

alteració en el nínxol immunològic pulmonar, augmentant les poblacions de macròfags alveolars, incrementant la infiltració de neutròfils al teixit i disminuint el comptatge de limfòcits. A més, l'expressió de varies citocines com CCL5 i CCL22 es veu disminuïda en el pulmó [41]. Tots aquests resultats, en conjunt amb els nostres, senyalen l'afectació pulmonar per la isquèmia com un altre dels processos que podrien contribuir a la susceptibilitat dels pacients amb ictus per a la SAP. La manera en que aquests processos hi contribuirien encara està per determinar. Una proposta seria que aquesta afectació pulmonar podria estar debilitant el sistema immune local, contribuint així a la susceptibilitat a la SAP, i que s'estarien activant una sèrie de mecanismes protectors per tal de contrarestar-la, que podrien estar mitjançats per, entre d'altres, HGF i/o TGF- α . Aquesta afirmació, però, es tracta només d'una hipòtesi que s'hauria de confirmar en estudis futurs.

Tal i com s'ha comentat al llarg d'aquesta tesi doctoral, actualment en la pràctica clínica no es disposa de teràpies preventives contra la SAP. Els antibiòtics profilàctics s'han estudiat en múltiples assajos clínics, tots indicant que no semblen tenir un efecte en la reducció de la SAP ni en la mortalitat dels pacients amb ictus. Les teràpies immunomoduladores podrien ser-ne l'alternativa. Tot i així, aquests tractaments no han tingut èxit més enllà dels estudis experimentals, així que la recerca en aquest camp ha de continuar activa [24]. Per aquest motiu, el coneixement de l'efecte local de l'ictus al pulmó, i el seu possible rol en la susceptibilitat dels pacients amb ictus per a la SAP podria obrir noves línies de recerca amb noves dianes terapèutiques.

Aquest estudi no està exempt de certes limitacions. En primer lloc, i com s'ha comentat anteriorment, només s'ha pogut avaluar un dels indicadors de dany pulmonar en els animals de l'estudi. A més, tampoc s'ha pogut estudiar la histologia pulmonar d'aquests animals per les dificultats inherents en el processament de les mostres de pulmó. Per altra banda, les proteïnes alterades s'han validat per dues tècniques diferents en les mateixes mostres, així que es requeriria una validació externa en un altre grup de ratolins isquèemics i *sham* per acabar de confirmar els nostres resultats.

Per tot això, es podria realitzar un nou estudi en el qual es poguessin avaluar tant marcadors de dany pulmonar com paràmetres ventilatoris, a diferents temps per tal de poder estudiar les alteracions pulmonars al llarg de la finestra temporal de la isquèmia. Una exploració histològica del pulmó també es requeriria, tant per avaluar el dany pulmonar a nivell estructural com per localitzar l'expressió de HGF, TGF- α i CCL2. D'aquesta manera, podríem intentar elucidar el seu rol i poder determinar si podrien

actuar com a possibles dianes terapèutiques en teràpies immunomoduladores locals. Si tot això es confirmés, el següent pas ja seria estudiar la contribució del dany pulmonar després de la isquèmia en la susceptibilitat a desenvolupar SAP en els pacients amb ictus.

5.5 Discussió global i perspectives de futur

Aquesta tesi ha intentat abordar la SAP des de diferents punts de vista, centrant-nos en la predicció i la prevenció d'aquesta. La prevenció de la SAP podria reduir els percentatges de discapacitat i mortalitat dels pacients amb ictus, ja que es tracta d'un factor de risc important d'ambdues [160].

Malauradament, les estratègies estudiades fins ara per a la prevenció d'aquesta, com l'ús de antibiòtics profilàctics, no han resultat exitoses. Un coneixement ampli de la patologia que hi ha darrera la malaltia permet la troballa de noves dianes terapèutiques. Per aquest motiu, en aquesta tesi hem volgut estudiar les afectacions que es donen al pulmó després de la isquèmia, i hem identificat algunes molècules alterades a nivell pulmonar després de la isquèmia cerebral.

Aquestes molècules, així com altres vies moleculars alterades a nivell pulmonar es podrien avaluar en un futur com a dianes terapèutiques per tal de promoure una resposta regeneradors del dany pulmonar, per intentar evitar el desenvolupament de la SAP. A més, treballar a nivell local comporta un cert avantatge ja que podríem evitar possibles efectes adversos que comporta actuar a nivell sistèmic. Tot i així, aquest és un escenari molt futur, i els esforços actuals en aquesta línia s'haurien de centrar en el discernir la rellevància del dany pulmonar i l'alteració d'aquestes molècules en la susceptibilitat dels pacients amb ictus a patir SAP.

Paral·lelament a la troballa de noves estratègies terapèutiques per a la prevenció de la SAP, els esforços també es centren en aquest àmbit en una millor estratificació del risc de patir SAP, mitjançant la mesura de biomarcadors predictors de la complicació. La predicció de la SAP permetria, en primer lloc, una millor monitorització dels pacients amb alt risc, i podria actuar com a guia per a l'antibioteràpia, evitant així les resistències antibiòtiques. De fet l'alta sensibilitat que proporcionen els panels de biomarcadors identificats en aquesta tesi podrien ser empleats en la pràctica clínica per evitar l'ús d'antibiòtics en pacients amb baix risc, fins i tot davant de símptomes poc específics com febre o secrecions respiratòries.

Tot i que els valors predictius que hem obtingut a l'estudi prospectiu son propers als desitjables per la seva implantació en la pràctica clínica, la predicció no es del tot òptima i el valor predictiu addicional sobre els predictors clínics d'infecció, especialment la gravetat de l'ictus i la disfàgia, es moderat. És per aquesta raó per la qual s'ha fet palesa la necessitat de descobrir nous biomarcadors en aquest àmbit. En aquest sentit, s'han emprat dues estratègies diferents: per una banda, l'ús de tècniques òmiques en subpoblacions leucocitàries; i per l'altra, la realització d'un anàlisi retrospectiu de biomarcadors triats per un altre *endpoint*. Aquests estudis han identificat nos candidats que podrien millorar la predicció del panel MR-proADM, SAA, CRP en el futur.

Com pas previ a la implantació en la pràctica clínica, els biomarcadors també podrien tenir un rol important en el disseny de futurs assajos clínics de teràpies preventives per a la SAP, ja que podrien permetre una bona identificació de pacients en alt risc de patir SAP. Aquests pacients podrien ser els candidats en els quals poder testar noves teràpies preventives. Fins i tot es podria re-testar l'ús d'antibioteràpia preventiva en aquests pacients molt seleccionats. Així, l'ús d'antibiòtics preventius podria ser testat en un nombre menor de pacients en els que la tasa d'infeccions sigui molt alta, població que podria obtenir un benefici de la mesura com en altres malalties on el risc d'infecció és més alt [161]. Ames, reduiríem la possibilitat de crear resistències bacterianes al incloure només pacients amb molt alt risc.

Una de les principals limitacions d'aquesta tesi, que ja s'ha comentat en l'apartat 1.3.2.1, és la falta d'un *gold-standard* per a la SAP. En aquesta tesi s'han emprat els criteris CDC en un dels estudis clínics (ja que quan es van recollir les dades dels pacients encara no s'havien publicat els criteris CDC modificats) i els criteris CDC modificats en els altres dos restants. Cal destacar que els criteris CDC modificats encara no han estat validats, i s'han estat estudiant tècniques d'imatge com el HR-TCT o la radiografia com a *gold-standard*, encara sense èxit. Això comporta una menor robustesa en els nostres resultats, ja que la malaltia no està encara del tot definida. En aquest sentit, els biomarcadors podrien funcionar com a eina complementària per al diagnòstic de la SAP.

Així doncs, les troballes d'aquesta tesi tenen recorregut de futur i obren noves possibilitats d'estudi en l'àmbit de la SAP. Per una banda, seria interessant incloure les ratis dels comptatges cel·lulars als models de regressió construïts en el Capítol I dels Resultats. A més, en els pacients reclutats en aquest estudi prospectiu, es podrien estudiar alguns dels candidats descoberts al Capítol II com són S100A8. Respecte a aquest Capítol, es podria qualificar mitjançant una tècnica diferent aquells candidats que

no han resultat detectables amb les tècniques emprades en aquesta tesi. A més, les dades obtingudes en els anàlisi -òmics poden servir per a l'estudi de la SIIS, per exemple utilitzant-los com a base per a la construcció de models *in-silico* de la malaltia per mitjà de la biologia de sistemes. Per últim, es requereix una validació dels resultats obtinguts al Capítol IV, i per això es podria realitzar un nou estudi, tal i com s'ha suggerit en l'apartat 5.4, per (i) confirmar les afectacions pulmonars observades, (ii) poder estudiar el paper que juguen HGF, CCL2, TGF- α a nivell local i (iii) identificar el rol d'aquestes processos en la SIIS.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions de la present tesi doctoral són les següents:

1. Un panell de biomarcadors format per SAA, CRP i MR-proADM incrementaria la capacitat predictiva per a la pneumònia associada a l'ictus dels models clínics tant en les primeres 24 hores després de l'ictus com entre les 24 i les 48 hores, proporcionant valors predictius superiors al 90%. Tot i així, aquest augment és lleu, així que es necessiten centrar esforços en descobrir nous biomarcadors per a la pneumònia associada a l'ictus.
2. Els neutròfils són la subpoblació leucocitària circulant en la que es poden observar més alteracions a nivell d'expressió en aquells pacients que desenvolupen pneumònia associada a l'ictus. La generació de gran quantitat de dades -òmiques en aquest àmbit podria ajudar a crear models *in-silico* per a conèixer més en profunditat la immunosupressió associada a l'ictus i trobar noves dianes terapèutiques.
3. L'ús de panells de biomarcadors sanguinis mesurats a l'ingrés del pacient amb ictus a l'hospital podrien ser útils per al pronòstic de complicacions associades a l'ictus com són la insuficiència cardíaca aguda descompensada i les infeccions respiratòries. Cal estudiar-ne el seu rol com a diferenciadors entre aquestes complicacions amb símptomes similars com la dispnea en estudis prospectius dissenyats específicament per l'estudi d'aquestes complicacions.
4. Després de la isquèmia cerebral, en els ratolins isquèemics trobem un dany pulmonar no associat ni al volum d'infart ni a una alteració en la permeabilitat de la barrera epitelial pulmonar. Les proteïnes CCL2, HGF i TGF- α s'alteren després de la isquèmia a nivell pulmonar. Aquest dany podria tenir una implicació en la susceptibilitat dels pacients amb ictus a patir pneumònia associada a l'ictus.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Hankey GJ. Stroke. *Lancet*. 2017;389:641–54.
2. Wafa HA, Wolfe CDA, Emmett E, Roth GA, Johnson CO, Wang Y. Burden of Stroke in Europe Thirty-Year. *Stroke*. 2020;51:2418–27.
3. Stevens E, Emmett E, Wang Y, McKeivitt C, Wolfe CDA. The Burden of Stroke in Europe Report. King's Coll. London Stroke Alliance Eur. 2017.
4. Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2020;1866:165260.
5. Kothari RU, Pancioli A, Liu T, Brott T, Broderick J. Cincinnati Prehospital Stroke Scale: reproducibility and validity. *Ann Emerg Med*. 1999;33:373–8.
6. Soro C, Capdevila M, Sánchez A, Patricia, Júdez C, Soto C, et al. ALTERACIONS NEUROLÒGIQUES: ICTUS, ACCIDENT VASCULAR CEREBRAL. GUIA Pract. Clin. Sist. D'EMERGENCIES MEDIQUES. Dep. Salut. CATALUNYA. 2016.
7. Alijanpour S, Mostafazdeh-Bora M, Ahmadi Ahangar A. Different Stroke Scales; Which Scale or Scales Should Be Used? *Casp J Intern Med*. 2021;12:1–21.
8. Yew KS, Cheng EM. Diagnosis of acute stroke. *Am Fam Physician*. 2015;91:528–36.
9. Katsanos AH, Safouris A, Sarraj A, Magoufis G, Leker RR, Khatri P, et al. Intravenous Thrombolysis with Tenecteplase in Patients with Large Vessel Occlusions: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2021;308–12.
10. Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, et al. Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med*. 2018;378:708–18.
11. Brott T, Adams HP, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989;20:864–70.
12. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke*. 1988;19:604–7.
13. Romain G, Mariet AS, Jooste V, Duloquin G, Thomas Q, Durier J, et al. Long-term relative survival after stroke: The dijon stroke registry. *Neuroepidemiology*. 2019;498–505.
14. Sun Y, Lee SH, Heng BH, Chin VS. 5-year survival and rehospitalization due to stroke

recurrence among patients with hemorrhagic or ischemic strokes in Singapore. *BMC Neurol.* 2013;13:133.

15. Béjot Y, Daubail B, Giroud M. Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: Current knowledge and perspectives. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172:59–68.

16. Schnitzler A, Woimant F, Tuppin P, De Peretti C. Prevalence of self-reported stroke and disability in the French adult population: A transversal study. *PLoS One.* 2014;9:1–15.

17. Mittmann N, Seung SJ, Hill MD, Phillips SJ, Hachinski V, Coté R, et al. Impact of disability status on ischemic stroke costs in Canada in the first year. *Can J Neurol Sci Le J Can des Sci Neurol.* 2012;39:793–800.

18. Iadecola C, Anrathner J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 2012;17:796–808.

19. Shim R, Wong CHY. Ischemia, immunosuppression and infection-tackling the predicaments of post-stroke complications. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1–18.

20. Ramiro L, Simats A, García-Berrocoso T, Montaner J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Ther Adv Neurol Disord.* 2018;11:1756286418789340.

21. Malone K, Amu S, Moore AC, Waeber C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol Cell Biol.* 2019;97:5–16.

22. Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke.* 2009;40:1849–57.

23. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol.* 2010;87:779–89.

24. Faura J, Bustamante A, Miró-Mur F, Montaner J. Stroke-induced immunosuppression: implications for the prevention and prediction of post-stroke infections. *J Neuroinflammation.* 2021;18:1–14.

25. Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell Type 1-like

immunostimulation. *J Exp Med.* 2003;198:725–36.

26. Yan FL, Zhang JH. Role of the sympathetic nervous system and spleen in experimental stroke-induced immunodepression. *Med Sci Monit.* 2014;20:2489–96.

27. Jiang C, Kong W, Wang Y, Ziai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget.* 2017;8:3553–67.

28. Chiu NL, Kaiser B, Nguyen YV, Welbourne S, Lall C, Cramer SC. The Volume of the Spleen and Its Correlates after Acute Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25:2958–61.

29. Liu Q, Jin WN, Liu Y, Shi K, Sun H, Zhang F, et al. Brain Ischemia Suppresses Immunity in the Periphery and Brain via Different Neurogenic Innervations. *Immunity.* 2017;46:474–87.

30. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52:595–638.

31. Engel O, Akyüz L, Da Costa Goncalves AC, Winek K, Dames C, Thielke M, et al. Cholinergic Pathway Suppresses Pulmonary Innate Immunity Facilitating Pneumonia after Stroke. *Stroke.* 2015;46:3232–40.

32. Lafargue M, Xu L, Carlès M, Serve E, Anjum N, Iles KE, et al. Stroke-induced activation of the $\alpha 7$ nicotinic receptor increases *Pseudomonas aeruginosa* lung injury . *FASEB J.* 2012;26:2919–29.

33. Wong CHY, Jenne CN, Lee W-Y, Léger C, Kubes P. Functional Innervation of Hepatic iNKT Cells Is Immunosuppressive Following Stroke. *Science* 2011;334:101–5.

34. Ruhnau J, Schulze K, Gaida B, Langner S, Kessler C, Broker B, et al. Stroke alters respiratory burst in neutrophils and monocytes. *Stroke.* 2014;45:794–800.

35. van Gemmeren T, Schuppner R, Grosse GM, Fering J, Gabriel MM, Huber R, et al. Early Post-Stroke Infections Are Associated with an Impaired Function of Neutrophil Granulocytes. *J Clin Med.* 2020;9:872.

36. Bai W, Li W, Ning YL, Li P, Zhao Y, Yang N, et al. Blood glutamate levels are closely related to acute lung injury and prognosis after stroke. *Front Neurol.* 2018;8:1–11.

37. Mrozek S, Constantin J-M, Geeraerts T. Brain-lung crosstalk: Implications for neurocritical care patients. *World J Crit Care Med.* 2015;4:163.
38. Mascia L. Acute lung injury in patients with severe brain injury: A double hit model. *Neurocrit Care.* 2009;11:417–26.
39. Samary CS, Ramos AB, Maia LA, Rocha NN, Santos CL, Magalhães RF, et al. Focal ischemic stroke leads to lung injury and reduces alveolar macrophage phagocytic capability in rats. *Crit Care. Critical Care;* 2018;22:1–11.
40. Austin V, Ku JM, Miller AA, Vlahos R. Ischaemic stroke in mice induces lung inflammation but not acute lung injury. *Sci Rep.* 2019;9:1–10.
41. Farris BY, Monaghan KL, Zheng W, Amend CD, Hu H, Ammer AG, et al. Ischemic stroke alters immune cell niche and chemokine profile in mice independent of spontaneous bacterial infection. *Immunity, Inflamm Dis.* 2019;7:326–41.
42. Bustamante A, García-Berrocoso T, Rodriguez N, Llombart V, Ribó M, Molina C, et al. Ischemic stroke outcome: A review of the influence of post-stroke complications within the different scenarios of stroke care. *Eur J Intern Med.* 2016;29:9–21.
43. Kumar S, Selim MH, Caplan LR. Medical complications after stroke. *Lancet Neurol.* 2010;9:105–18.
44. Badve MS, Zhou Z, van de Beek D, Anderson CS, Hackett ML. Frequency of post-stroke pneumonia: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Stroke.* 2019;14:125–36.
45. Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Vermeij JD, Dijkgraaf MG, van de Beek D. Post-stroke infection: A systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.* 2011;11:110.
46. Liu DD, Chu SF, Chen C, Yang PF, Chen NH, He X. Research progress in stroke-induced immunodepression syndrome (SIDS) and stroke-associated pneumonia (SAP). *Neurochem Int.* 2018;114:42–54.
47. Suda S, Aoki J, Shimoyama T, Suzuki K, Sakamoto Y, Katano T, et al. Stroke-associated infection independently predicts 3-month poor functional outcome and mortality. *J Neurol.* 2018;265:370–5.
48. Wartenberg KE, Stoll A, Funk A, Meyer A, Schmidt JM, Berrouschot J. Infection after acute ischemic stroke: Risk factors, biomarkers, and outcome. *Stroke Res Treat.*

2011;2011:1–8.

49. Sari IM, Soertidewi L, Yokota C, Kikuno M, Koga M, Toyoda K. Comparison of Characteristics of Stroke-Associated Pneumonia in Stroke Care Units in Indonesia and Japan. *J stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26:280–5.

50. Eltringham SA, Kilner K, Gee M, Sage K, Bray BD, Pownall S, et al. Impact of Dysphagia Assessment and Management on Risk of Stroke-Associated Pneumonia: A Systematic Review. *Cerebrovasc Dis.* 2018;46:97–105.

51. Teh WH, Smith CJ, Barlas RS, Wood AD, Bettencourt-Silva JH, Clark AB, et al. Impact of stroke-associated pneumonia on mortality, length of hospitalization, and functional outcome. *Acta Neurol Scand.* 2018;138:293–300.

52. Ali AN, Howe J, Majid A, Redgrave J, Pownall S, Abdelhafiz AH. The economic cost of stroke-associated pneumonia in a UK setting. *Top Stroke Rehabil.* 2018;25:214–23.

53. Smith CJ, Kishore AK, Vail A, Chamorro A, Garau J, Hopkins SJ, et al. Diagnosis of Stroke-Associated Pneumonia: Recommendations From the Pneumonia in Stroke Consensus Group. *Stroke.* 2015;46:2335–40.

54. Kishore AK, Vail A, Chamorro A, Garau J, Hopkins SJ, Di Napoli M, et al. How Is Pneumonia Diagnosed in Clinical Stroke Research? *Stroke.* 2015;46:1202–9.

55. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36:309–32.

56. Zapata-Arriaza E, Serrano-Gotarredona P, Navarro-Herrero S, Moniche F, Pardo-Galiana B, Pallisa E, et al. Chest computed tomography findings and validation of clinical criteria of stroke associated pneumonia. *J Stroke.* 2019;21:217–9.

57. Kishore AK, Devaraj A, Vail A, Ward K, Thomas PG, Sen D, et al. Use of Pulmonary Computed Tomography for Evaluating Suspected Stroke-Associated Pneumonia. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2021;30:105757.

58. Prosser J, MacGregor L, Lees KR, Diener HC, Hacke W, Davis S. Predictors of early cardiac morbidity and mortality after ischemic stroke. *Stroke.* 2007;38:2295–302.

59. Gattringer T, Niederkorn K, Seyfang L, Seifert-Held T, Simmet N, Ferrari J, et al. Myocardial infarction as a complication in acute stroke: results from the austrian stroke

unit registry. *Cerebrovasc Dis.* 2014;37:147–52.

60. Burkot J, Kopec G, Pera J, Slowik A, Dziedzic T. Decompensated Heart Failure is a Strong Independent Predictor of Functional Outcome after Ischemic Stroke. *J Card Fail.* 2015;21:642–6.

61. Kishore AK, Vail A, Bray BD, Chamorro A, Napoli M Di, Kalra L, et al. Clinical risk scores for predicting stroke-associated pneumonia: A systematic review. *Eur Stroke J.* 2016;1:76–84.

62. Wästfelt M, Cao Y, Ström JO. Predictors of post-stroke fever and infections: A systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.* 2018;18:1–8.

63. Cohen DL, Roffe C, Beavan J, Blackett B, Fairfield CA, Hamdy S, et al. Post-stroke dysphagia: A review and design considerations for future trials. *Int J Stroke.* 2016;11:399–411.

64. Yuan M, Li Q, Zhang R, Zhang W, Zou N, Qin X, et al. Risk factors for and impact of poststroke pneumonia in patients with acute ischemic stroke. 2021;12.

65. Feng MC, Lin YC, Chang YH, Chen CH, Chiang HC, Huang LC, et al. The Mortality and the Risk of Aspiration Pneumonia Related with Dysphagia in Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019;28:1381–7.

66. Hoffmann S, Harms H, Ulm L, Nabavi DG, Mackert BM, Schmehl I, et al. Stroke-induced immunodepression and dysphagia independently predict stroke-associated pneumonia – The PREDICT study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37:3671–82.

67. Kishore AK, Jeans AR, Garau J, Bustamante A, Kalra L, Langhorne P, et al. Antibiotic treatment for pneumonia complicating stroke: Recommendations from the pneumonia in stroke consensus (PISCES) group. *Eur Stroke J.* 2019;4:318–28.

68. Kishore AK, Vail A, Jeans AR, Chamorro A, Di Napoli M, Kalra L, et al. Microbiological Etiologies of Pneumonia Complicating Stroke: A Systematic Review. *Stroke.* 2018;49:1602–9.

69. Vermeij JD, Westendorp WF, Dippel DWJ, van de Beek D, Nederkoorn PJ. Antibiotic therapy for preventing infections in people with acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;1:CD008530.

70. Badve MS, Zhou Z, Anderson CS, Hackett ML. Effectiveness and Safety of Antibiotics

for Preventing Pneumonia and Improving Outcome after Acute Stroke: Systematic Review and Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018;27:3137–47.

71. Liu L, Xiong XY, Zhang Q, Fan XT, Yang QW. The Efficacy of Prophylactic Antibiotics on Post-Stroke Infections: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2016;6:1–8.

72. Westendorp WF, Vermeij J-D, Zock E, Hooijenga IJ, Kruyt ND, Bosboom HJLW, et al. The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): a pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial. *Lancet.* 2015;385:1519–26.

73. Kalra L, Irshad S, Hodsoll J, Simpson M, Gulliford M, Smithard D, et al. Prophylactic antibiotics after acute stroke for reducing pneumonia in patients with dysphagia (STROKE-INF): a prospective, cluster-randomised, open-label, masked endpoint, controlled clinical trial. *Lancet.* 2015;386:1835–44.

74. Deng QW, Yang H, Yan FL, Wang H, Xing FL, Zuo L, et al. Blocking Sympathetic Nervous System Reverses Partially Stroke-Induced Immunosuppression but does not Aggravate Functional Outcome After Experimental Stroke in Rats. *Neurochem Res.* Springer US; 2016;41:1877–86.

75. Sykora M, Siarnik P, Diedler J. β -Blockers, Pneumonia, and Outcome after Ischemic Stroke. *Stroke.* 2015;46:1269–74.

76. Maier IL, Karch A, Mikolajczyk R, Bähr M, Liman J. Effect of beta-blocker therapy on the risk of infections and death after acute stroke - A historical cohort study. *PLoS One.* 2015;10:1–10.

77. Jin R, Liu S, Wang M, Zhong W, Li G. Inhibition of CD147 attenuates stroke-associated pneumonia through modulating lung immune response in mice. *Front Neurol.* 2019;10:1–15.

78. Guan YT, Mao LL, Jia J, Dong CS, Zhou XM, Zheng SL, et al. Postischemic administration of a potent PTEN inhibitor reduces spontaneous lung infection following experimental stroke. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19:990–3.

79. Dames C, Winek K, Beckers Y, Engel O, Meisel A, Meisel C. Immunomodulatory treatment with systemic GM-CSF augments pulmonary immune responses and improves neurological outcome after experimental stroke. *J Neuroimmunol.* 2018;321:144–9.

80. Maier IL, Becker JC, Leyhe JR, Schnieder M, Behme D, Psychogios MN, et al.

Influence of beta-blocker therapy on the risk of infections and death in patients at high risk for stroke induced immunodepression. *PLoS One*. 2018;13:1–11.

81. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. United States; 2001;69:89–95.

82. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46:915–20.

83. Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, Sánchez-Poblet J, García-Berrocoso T, Giralt D, et al. C-Reactive Protein in the Detection of Post-Stroke Infections: Systematic Review and Individual Participant Data Analysis. *J Neurochem*. 2017;141:305–14.

84. Schweizer J, Bustamante A, Lapierre-Fétaud V, Faura J, Scherrer N, Azurmendi Gil L, et al. SAA (Serum Amyloid A): A Novel Predictor of Stroke-Associated Infections. *Stroke*. 2020;51:3523–30.

85. Xie J, Zhang XH, Zhu WY. Values for serum procalcitonin, C-reactive protein, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in predicting survival of patients with early-onset stroke-associated pneumonia. *Genet Mol Res*. 2015;14:4716–23.

86. Fluri F, Morgenthaler NG, Mueller B, Christ-Crain M, Katan M. Copeptin, Procalcitonin and Routine Inflammatory Markers-Predictors of Infection after Stroke. *PLoS One*. 2012;7.

87. Bustamante A, García-Berrocoso T, Penalba A, Giralt D, Simats A, Muchada M, et al. Sepsis biomarkers reprofiling to predict stroke-associated infections. *J Neuroimmunol*. 2017;312:19–23.

88. Nam KW, Kim TJ, Lee JS, Kwon HM, Lee YS, Ko SB, et al. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts stroke-associated pneumonia. *Stroke*. 2018;49:1886–92.

89. Worthmann H, Tryc AB, Dirks M, Schuppner R, Brand K, Klawonn F, et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J Neuroinflammation*. 2015;12:1–9.

90. Chamorro Á, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera Á, Torres F, et al. Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:1279–81.

91. Salat D, Penalba A, García-Berrocoso T, Campos-Martorell M, Flores A, Pagola J, et al. Immunological biomarkers improve the accuracy of clinical risk models of infection in the acute phase of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35:220–7.
92. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2006;24:971–83.
93. Chambers DC, Carew AM, Lukowski SW, Powell JE. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing. *Respirology*. 2019;24:29–36.
94. Tachibana C. Transcriptomics today: Microarrays, RNA-seq, and more. *Science*. 2015;80:544–6.
95. Jafari M, Primo V, Smejkal GB, Moskovets E V., Kuo WP, Ivanov AR. Comparison of in-gel protein separation techniques commonly used for fractionation in mass spectrometry-based proteomic profiling. *Electrophoresis*. 2012;33:2516–26.
96. Olink. Protein biomarker discovery - Olink. <https://www.olink.com/>. 2021.
97. Simats A, García-Berrocoso T, Ramiro L, Giralt D, Gill N, Penalba A, et al. Characterization of the rat cerebrospinal fluid proteome following acute cerebral ischemia using an aptamer-based proteomic technology. *Sci Rep*. 2018;8:1–14.
98. Smith CJ, Kishore AK, Vail A, Chamorro A, Garau J, Hopkins SJ, et al. Diagnosis of Stroke-Associated Pneumonia: Recommendations From the Pneumonia in Stroke Consensus Group. *Stroke*. 2015;46:2335–40.
99. Huang GQ, Cheng HR, Wu YM, Cheng QQ, Wang YM, Fu JL, et al. Reduced vitamin D levels are associated with stroke-associated pneumonia in patients with acute ischemic stroke. *Clin Interv Aging*. 2019;14:2305–14.
100. Simats A, Ramiro L, García-Berrocoso T, Briansó F, Gonzalo R, Martín L, et al. A Mouse Brain-based Multi-omics Integrative Approach Reveals Potential Blood Biomarkers for Ischemic Stroke. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19:1921–35.
101. Kauffmann A, Gentleman R, Huber W. arrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*. 2009;25:415–6.
102. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249–64.

Bibliografia

103. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47.
104. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B.* 1995;57:289–300.
105. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol.* 2012;16:284–7.
106. The Gene Ontology Consortium. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Gen.* 200AD;25:25–9.
107. Carbon S, Douglass E, Good BM, Unni DR, Harris NL, Mungall CJ, et al. The Gene Ontology resource: Enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:D325–34.
108. Bustamante A, López-Cancio E, Pich S, Penalba A, Giralt D, García-Berrocoso T, et al. Blood Biomarkers for the Early Diagnosis of Stroke: The Stroke-Chip Study. *Stroke.* 2017;48:2419–25.
109. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey Jr DE, Ganiats TG, Holmes Jr DR, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014;130:2354–94.
110. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8:6–10.
111. Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, Eckenstein F. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Neurol Res.* 1997;19:641–8.
112. van Hoecke L, Job ER, Saelens X, Roose K. Bronchoalveolar lavage of murine lungs to analyze inflammatory cell infiltration. *J Vis Exp.* 2017;2017:1–8.
113. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986;17:1304–8.
114. Morancho A, García-Bonilla L, Barceló V, Giralt D, Campos-Martorell M, Garcia S,

- et al. A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012;38:617–27.
115. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
116. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
117. Önal U, Valenzuela-Sánchez F, Vandana K, Rello J. Mid-Regional Pro-Adrenomedullin (MR-proADM) as a Biomarker for Sepsis and Septic Shock: Narrative Review. *Healthcare.* 2018;6:110.
118. Zapata-Arriaza E, Mancha F, Bustamante A, Moniche F, Pardo-Galiana B, Serrano-Gotarredona P, et al. Biomarkers predictive value for early diagnosis of Stroke-Associated Pneumonia. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6.
119. Warusevitane A, Karunatilake D, Sim J, Smith C, Roffe C. Early diagnosis of pneumonia in severe stroke: clinical features and the diagnostic role of C-Reactive protein. *PLoS One.* 2016;11:1–11.
120. Gil LA, Krattinger-Turbatu L, Schweizer J, Katan M, Sanchez JC. A panel comprising serum amyloid a, white blood cells and nihss for the triage of patients at low risk of post-stroke infection. *Diagnostics.* 2021;11.
121. Zhang Y, Zhang J, Sheng H, Li H, Wang R. Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. *Adv Clin Chem. United States;* 2019;90:25–80.
122. Caruhel P, Mazier C, Kunde J, Morgenthaler NG, Darbouret B. Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay for the measurement of midregional proadrenomedullin in plasma on the fully automated system B.R.A.H.M.S KRYPTOR. *Clin Biochem. United States;* 2009;42:725–8.
123. Martínez-González NA, Keizer E, Plate A, Coenen S, Valeri F, Verbakel JYJ, et al. Point-of-care c-reactive protein testing to reduce antibiotic prescribing for respiratory tract infections in primary care: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Antibiotics.* 2020;9:1–31.
124. Li Y, Liu X, Guo J, Zhang Y, Guo J, Wu X, et al. Simultaneous detection of inflammatory biomarkers by sers nanotag-based lateral flow assay with portable cloud

raman spectrometer. *Nanomaterials*. 2021;11:1–14.

125. Montaner J, Ramiro L, Simats A, Tiedt S, Makris K, Jickling GC, et al. Multilevel omics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets for stroke. *Nat Rev Neurol*. 2020;16:247–64.

126. Bustamante A, Penalba A, Orset C, Azurmendi L, Llombart V, Simats A, et al. Blood Biomarkers to Differentiate Ischemic and Hemorrhagic Strokes. *Neurology*. 2021;96:e1928–39.

127. Pernemalm M, Lehtiö J. Mass spectrometry-based plasma proteomics: State of the art and future outlook. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11:431–48.

128. Pullagurla SR, Witek MA, Jackson JM, Lindell MAM, Hupert ML, Nesterova I V., et al. Parallel affinity-based isolation of leukocyte subsets using microfluidics: Application for stroke diagnosis. *Anal Chem*. 2014;86:4058–65.

129. O’Connell GC, Chang JHC. Analysis of early stroke-induced changes in circulating leukocyte counts using transcriptomic deconvolution. *Transl Neurosci*. 2018;9:161–6.

130. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in inflammation. *Front Immunol*. 2018;9.

131. Okada K, Okabe M, Kimura Y, Itoh H, Ikemoto M. Serum S100A8/A9 as a Potentially Sensitive Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Lab Med*. 2019;50:370–80.

132. Kang KY, Woo JW, Park SH. S100A8/A9 as a biomarker for synovial inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med*. 2014;29:12–9.

133. Tsang H-F, Xue VW, Koh S-P, Chiu Y-M, Ng LP-W, Wong S-CC. NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:95–103.

134. Tavassoly I, Goldfarb J, Iyengar R. Systems biology primer: the basic methods and approaches. *Essays Biochem*. 2018;62:487–500.

135. Bustamante A, Díaz-Fernández B, Pagola J, Blanco-Grau A, Rubiera M, Penalba A, et al. Admission troponin-I predicts subsequent cardiac complications and mortality in acute stroke patients. *Eur Stroke J*. 2016;1:205–12.

136. Adamcova M, Šimko F. Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases

perspective. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39:1068–72.

137. Mallick A, Januzzi Jr JL. Biomarkers In Acute Heart Failure. *Rev Esp Cardiol.* 2015;68:514–25.

138. Boomsma F, Van Veldhuisen DJ, De Kam PJ, Man In 'T Veld AJ, Mosterd A, Lie KI, et al. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 1997;33:387–91.

139. Boomsma F, De Kam PJ, Tjeerdsma G, Van Den Meiracker AH, Van Veldhuisen DJ. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) is an independent prognostic marker for mortality in chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2000;21:1859–63.

140. de Boer RA, Naylor M, deFilippi CR, Enserro D, Bhambhani V, Kizer JR, et al. Association of Cardiovascular Biomarkers With Incident Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JAMA Cardiol.* 2018;3:215–24.

141. Wannamethee SG, Whincup PH, Papacosta O, Lennon L, Lowe GD. Associations between blood coagulation markers, NT-proBNP and risk of incident heart failure in older men: The British Regional Heart Study. *Int J Cardiol.* 2017;230:567–71.

142. Kwan J, Horsfield G, Bryant T, Gawne-Cain M, Durward G, Byrne CD, et al. IL-6 is a predictive biomarker for stroke associated infection and future mortality in the elderly after an ischemic stroke. *Exp Gerontol.* 2013;48:960–5.

143. Bustamante A, Sobrino T, Giralt D, García-Berrocoso T, Llombart V, Ugarriza I, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: A systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol.* 2014;274:215–24.

144. Arslan S, Ugurlu S, Bulut G, Akkurt I. The association between plasma d-dimer levels and community-acquired pneumonia. *Clinics.* 2010;65:593–7.

145. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ. Von Willebrand factor: More than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol.* 2012;128:158–69.

146. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Chabert A, Pozzetto B, Cognasse F, Garraud O. Platelets and infections - Complex interactions with bacteria. *Front Immunol.* 2015;6:1–18.

147. Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, et al. Von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood.* 2010;116:4712–9.

148. Li Y, Liu C, Xiao W, Song T, Wang S. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Ventilator-Associated Pneumonia in Traumatic Brain Injury: A Meta-analysis. *Neurocrit Care*. 2020;32:272–85.
149. Crapser J, Ritzel R, Verma R, Venna VR, Liu F, Chauhan A, et al. Ischemic stroke induces gut permeability and enhances bacterial translocation leading to sepsis in aged mice. *Aging*. 2016;8:1049–63.
150. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol. Netherlands*; 2013;45:2568–73.
151. Bissonnette EY, Lauzon-Joset JF, Debley JS, Ziegler SF. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;11:1–12.
152. Panganiban RAM, Day RM. Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32:12–20.
153. Stern JB, Fierobe L, Paugam C, Rolland C, Dehoux M, Petiet A, et al. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*. 2000;28:2326–33.
154. Yanagita K, Matsumoto K, Sekiguchi K, Ishibashi H, Niho Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute lung injury. *J Biol Chem*. 1993;268:21212–7.
155. van Zoelen MAD, Verstege MI, Draing C, de Beer R, van't Veer C, Florquin S, et al. Endogenous MCP-1 promotes lung inflammation induced by LPS and LTA. *Mol Immunol*. 2011;48:1468–76.
156. Hinkle CL, Mohan MJ, Lin P, Yeung N, Rasmussen F, Milla ME, et al. Multiple metalloproteinases process protransforming growth factor-alpha (proTGF-alpha). *Biochemistry*. 2003;42:2127–36.
157. Madtes DK, Busby HK, Strandjord TP, Clark JG. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11:540–51.
158. Hardie WD, Prows DR, Leikauf GD, Korfhagen TR. Attenuation of acute lung injury in transgenic mice expressing human transforming growth factor-alpha. *Am J Physiol*.

United States; 1999;277:L1045-50.

159. Hardie WD, Prows DR, Piljan-Gentle A, Dunlavy MR, Wesselkamper SC, Leikauf GD, et al. Dose-related protection from nickel-induced lung injury in transgenic mice expressing human transforming growth factor-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26:430–7.

160. Yuan M, Li Q, Zhang R, Zhang W, Zou N, Qin X, et al. Risk factors for and impact of poststroke pneumonia in patients with acute ischemic stroke. *Medicine (Baltimore).* 2021;100:e25213.



161. Póvoa FCC, Cardinal-Fernandez P, Maia IS, Reboredo MM, Pinheiro BV. Effect of antibiotics administered via the respiratory tract in the prevention of ventilator-associated pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *J Crit Care.* 2018;43:240–5.

8. ANNEX

Blood Biomarker Panels for the Early Prediction of Stroke-Associated Complications. Faura et al. J Am Heart Assoc. 2021; 10:e018946

ORIGINAL RESEARCH

Blood Biomarker Panels for the Early Prediction of Stroke-Associated Complications

Júlia Faura , MSc; Alejandro Bustamante , MD, PhD; Silvia Reverté, PhD; Teresa García-Berrocó, PhD; Mónica Millán, MD, PhD; Mar Castellanos , MD, PhD; Blanca Lara-Rodríguez, MD; Josep Zaragoza, MD; Oriol Ventura, MSc; María Hernández-Pérez, MD, PhD; Cecile van Eendenburg, MD; Pere Cardona, MD, PhD; Elena López-Cancio , MD, PhD; David Cánovas, MD, PhD; Joaquín Serena , MD, PhD; Marta Rubiera , MD, PhD; Antoni Dávalos, MD, PhD; Joan Montaner , MD, PhD

BACKGROUND: Acute decompensated heart failure (ADHF) and respiratory tract infections (RTIs) are potentially life-threatening complications in patients experiencing stroke during hospitalization. We aimed to test whether blood biomarker panels might predict these complications early after admission.

METHODS AND RESULTS: Nine hundred thirty-eight patients experiencing ischemic stroke were prospectively recruited in the Stroke-Chip study. Post-stroke complications during hospitalization were retrospectively evaluated. Blood samples were drawn within 6 hours after stroke onset, and 14 biomarkers were analyzed by immunoassays. Biomarker values were normalized using log-transformation and Z score. PanelomiX algorithm was used to select panels with the best accuracy for predicting ADHF and RTI. Logistic regression models were constructed with the clinical variables and the biomarker panels. The additional predictive value of the panels compared with the clinical model alone was evaluated by receiver operating characteristic curves. An internal validation through a 10-fold cross-validation with 3 repeats was performed. ADHF and RTI occurred in 19 (2%) and 86 (9.1%) cases, respectively. Three-biomarker panels were developed as predictors: vascular adhesion protein-1 >5.67, NT-proBNP (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide) >4.98 and D-dimer >5.38 (sensitivity, 89.5%; specificity, 71.7%) for ADHF; and interleukin-6 >3.97, von Willebrand factor >3.67, and D-dimer >4.58 (sensitivity, 82.6%; specificity, 59.8%) for RTI. Both panels independently predicted stroke complications (panel for ADHF: odds ratio [OR] [95% CI], 10.1 [3–52.2]; panel for RTI: OR, 3.73 [1.95–7.14]) after adjustment by clinical confounders. The addition of the panel to clinical predictors significantly improved areas under the curve of the receiver operating characteristic curves in both cases.

CONCLUSIONS: Blood biomarkers could be useful for the early prediction of ADHF and RTI. Future studies should assess the usefulness of these panels in front of patients experiencing stroke with respiratory symptoms such as dyspnea.

Key Words: ADHF ■ biomarkers ■ stroke ■ stroke-associated infection

Mortality of patients experiencing stroke in Europe ranges from 13% to 35%.¹ Acute post-stroke complications, such as respiratory infections and cardiac complications, are major causes of death in patients experiencing acute stroke.² Early detection and treatment of these medical complications might

represent an opportunity to further improve the outcome of these patients.³

Acute decompensated heart failure (ADHF) is defined as a new onset or rapidly or gradual worsening of heart failure (HF) symptoms that require urgent therapy.⁴ A frequency of 17% of ADHF in acute stroke

Correspondence to: Alejandro Bustamante, MD, PhD, Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. E-mail: abustamante.germanstrias@gencat.cat

For Sources of Funding and Disclosures, see page 7.

© 2021 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

JAHA is available at: www.ahajournals.org/journal/jaha

CLINICAL PERSPECTIVE

What Is New?

- This is a retrospective study of a multicenter cohort with 938 patients experiencing ischemic stroke in which the measurement of 14 biomarkers was performed with early blood samples, extracted in the first 6 hours after the episode.
- Two biomarker combinations add predictive value to the clinical models for the prediction of 2 major complications after stroke: acute decompensated heart failure and respiratory tract infections.

What Are the Clinical Implications?

- These 2 biomarker panels, jointly with clinical variables, would be able to predict acute decompensated heart failure and respiratory tract infection in the first hours after stroke.
- This would allow clinicians to monitor the patients at the highest risk to experience these pathologies and treat them accordingly, reducing the length of stay and the mortality of these patients.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ADHF	acute decompensated heart failure
RTI	respiratory tract infections
vWF	Von Willebrand factor

patients has been reported, and this cardiac complication is a strong independent predictor of poor functional outcome in these patients.⁵

Respiratory tract infection (RTI) represents a well-known complication in patients experiencing stroke, and its frequency is around 12%.⁶ RTIs are also linked with poor functional outcome of the patients, a prolonged length of stay in the hospital, and increased mortality up to 1 year.⁷

Both RTI and ADHF may have common symptoms such as dyspnea, and early chest radiograph may not show typical changes, so differentiating between the 2 clinical conditions can be difficult in daily clinical practice. In this context, blood biomarkers might serve as a useful tool to identify those patients at the highest risk of developing these complications, as well as for the early differential diagnosis of post-stroke RTI or ADHF.

In this study, we aimed to test whether blood biomarkers measured at admission might identify patients at the highest risk of RTI or ADHF.

METHODS

The present study represents a retrospective analysis of the patients experiencing ischemic stroke prospectively recruited at the multicenter Stroke-Chip study.⁸ Certified neurologists, blinded to the biomarker analytic results, retrospectively evaluated clinical records to determine the occurrence of post-stroke complications during hospitalization. The Stroke-Chip study protocol was approved by each recruiting center's ethics committee, and all patients or relatives gave written informed consent. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Diagnosis of Post-Stroke Complications

ADHF was defined, according to American Heart Association Guidelines,⁹ as new onset of dyspnea and/or fatigue, together with fluid retention, which may lead to pulmonary, or splanchnic congestion or peripheral edema, in the absence of other causes of dyspnea.

RTIs were diagnosed according to the Centers for Disease Control and Prevention criteria.¹⁰ In summary, the diagnosis of RTI required the presence of fever (body temperature $>38^{\circ}\text{C}$) or elevated white blood cell count ($>1.2 \times 10^{10}/\text{L}$) and evidence of organ-specific involvement (purulent sputum, pulmonary infiltrate, cough, etc) or a positive blood culture. RTIs were classified as upper RTI, lower RTI, and pneumonia. An abnormal chest radiograph was required for the diagnosis of stroke-associated pneumonia.

Blood Sample Collection and Biomarker Measurement

Samples were drawn at admission, within 6 hours after stroke onset, and before the administration of acute-phase therapies such as reperfusion. Blood was collected into EDTA tubes, centrifuged at 1500g for 15 minutes at 4°C , and plasma aliquots were frozen at -80°C until biomarker measurement.

A 14-biomarker panel was measured. This panel included insulin-like growth factor-binding protein-3, tumor necrosis factor receptor-1, growth-related oncogene- α , Fas ligand, heat shock 70 kDa protein-8, NT-proBNP (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide), D-dimer, interleukin-6, von Willebrand factor (vWF), vascular adhesion protein-1, endostatin, S100 calcium-binding protein B, apolipoprotein CIII, and neuron cell adhesion molecule. The selection of these biomarkers and the measurement methods were described previously.⁸

Biomarker values were log-transformed with a base of 10 and divided by the value of the control sample of each plate. Because of the high intra-assay variability

for some of the molecules, all the values were standardized by means of Z score.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted with Statistical Packages for Social Sciences (version 22; SPSS Inc., Chicago, IL) and R software (version 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Normality of the continuous variables was assumed because of the

size of the sample according to the central limit theorem. The univariate analysis was performed using the χ^2 test for categorical variables and *t*-test for continuous variables. Binary logistic regression models were developed. Putative confounders based on previous literature were added to the models to adjust them. Multicollinearity among the predictor variables has been checked with the variance inflation factor. Firth correction was applied ("logistf" package in R) when constructing the binary

Table 1. Univariate Analysis for ADHF and RTI After Stroke

	ADHF			RTI		
	No (N=919)	Yes (N=19)	P Value	No (N=852)	Yes (N=86)	P Value
Age, y	72.52 (\pm 13)	81.1 (\pm 13.5)	<0.0001*	72.2 (\pm 13)	77.2 (\pm 12.3)	0.001†
Sex, female	420 (45.7)	11 (57.9)	0.291	388 (45.6)	42 (48.8)	0.572
Hypertension	675 (73.4)	13 (68.4)	0.624	617 (72.6)	69 (80.2)	0.127
Dyslipemia	451 (49.1)	9 (47.4)	0.883	421 (49.5)	38 (44.2)	0.345
Diabetes mellitus	237 (25.8)	2 (10.5)	0.184	214 (25.2)	25 (29.1)	0.430
Tobacco	149 (16.2)	3 (15.8)	0.999	144 (16.9)	8 (9.3)	0.067
Alcohol	64 (7)	1 (5.3)	0.999	64 (7.5)	1 (1.2)	0.027‡
Atrial fibrillation	318 (34.6)	11 (57.9)	0.035†	282 (33.2)	46 (53.5)	<0.0001*
Coronary disease	145 (15.8)	7 (36.8)	0.023†	132 (15.5)	19 (22.1)	0.115
Previous stroke	158 (17.2)	5 (26.3)	0.353	144 (16.9)	18 (20.9)	0.351
Previous mRS	0 (0–1)	1.5 (0–3)	0.001*	0 (0–1)	1 (0–3)	<0.0001*
Baseline NIHSS	9 (\pm 7.3)	15 (\pm 4.9)	<0.0001*	8.5 (\pm 7.1)	15.5 (\pm 6)	<0.0001*
TOAST						
CE	330 (40.7)	11 (84.6)	0.050	337 (40.1)	46 (55.4)	0.007†
LAA	116 (14.3)	0 (0)		115 (13.7)	10 (12)	
Lacunar	109 (11.9)	0 (0)		119 (14.1)	2 (2.4)	
Undetermined	240 (29.6)	2 (15.4)		255 (30.3)	22 (26.5)	
Other	15 (1.9)	0 (0)		15 (1.8)	3 (3.6)	
In-hospital mortality	108 (9.9)	8 (42.1)	<0.0001*	44 (5.2)	30 (34.9)	<0.0001*
3-mo disability	366 (42.2)	16 (84.32)	<0.0001*	221 (32.6)	67 (89.3)	<0.0001*
Apolipoprotein CIII	4.02 (\pm 0.97)	3.68 (\pm 0.98)	0.144	4.01 (\pm 0.98)	3.99 (\pm 0.93)	0.778
D-dimer	4.08 (\pm 0.95)	4.60 (\pm 0.79)	0.020‡	4.05 (\pm 0.94)	4.53 (\pm 0.93)	<0.0001*
Endostatin	4.11 (\pm 0.94)	4.50 (\pm 0.89)	0.073	4.09 (\pm 0.93)	4.35 (\pm 1.08)	0.015‡
GROA	3.99 (\pm 0.97)	3.96 (\pm 0.87)	0.881	4.00 (\pm 0.98)	3.94 (\pm 0.93)	0.582
Interleukin-6	4.00 (\pm 0.96)	4.24 (\pm 0.77)	0.265	3.95 (\pm 0.94)	4.49 (\pm 1.02)	<0.0001*
NT-proBNP	4.12 (\pm 0.95)	5.03 (\pm 0.87)	<0.0001*	4.11 (\pm 0.95)	4.45 (\pm 0.91)	0.001*
VAP-1	4.05 (\pm 0.99)	4.79 (\pm 1.05)	0.001*	4.05 (\pm 0.98)	4.19 (\pm 1.12)	0.199
vWF	4.02 (\pm 0.97)	4.25 (\pm 0.88)	0.306	3.97 (\pm 0.97)	4.49 (\pm 0.89)	<0.0001*
IGFBP-3	4.00 (\pm 0.98)	3.91 (\pm 1.07)	0.694	3.99 (\pm 0.98)	4.10 (\pm 1.05)	0.330
Fas ligand	3.96 (\pm 0.99)	4.40 (\pm 0.72)	0.056	3.95 (\pm 0.99)	4.16 (\pm 0.99)	0.065
TNF-R1	4.04 (\pm 0.98)	4.36 (\pm 0.52)	0.038‡	4.04 (\pm 0.97)	4.17 (\pm 1.03)	0.235
NCAM	3.98 (\pm 0.99)	4.36 (\pm 0.76)	0.090	3.99 (\pm 0.98)	3.91 (\pm 1.03)	0.498
S100B	4.03 (\pm 0.98)	3.72 (\pm 0.87)	0.233	4.02 (\pm 0.99)	3.95 (\pm 0.91)	0.558
Hsc70	4.04 (\pm 0.95)	4.18 (\pm 1.09)	0.567	4.04 (\pm 0.95)	4.13 (\pm 0.92)	0.414

Values are reported as n (%) or mean (\pm SD). Biomarker values are standardized. ADHF indicates acute decompensated heart failure; CE, cardiac embolism; DBP, diastolic blood pressure; GROA, growth-related oncogene- α ; Hsc70, heat shock 70 kDa protein-8; IGFBP-3, insulin-like growth factor-binding protein-3; LAA, large-artery atherothrombosis; mRS, modified rankin scale; NCAM, neuron cell adhesion molecule; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; NTproBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; RTI, respiratory tract infection; S100B, S100 calcium-binding protein B; SBP, systolic blood pressure; TNF-R1, tumor necrosis factor receptor-1; TOAST, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment; and VAP-1, vascular adhesion protein-1.

**P*<0.001.

†*P*<0.01.

‡*P*<0.05.

logistic regression models for ADHF to minimize the estimates of the coefficients, as there is a low rate of events.

To avoid overfitting the models with individual biomarkers, the best biomarker combination for the prediction of the defined complications was selected using PanelomiX algorithm,¹¹ optimizing the combination by accuracy with a maximum of 3 biomarkers. The analyses for the selection of the best biomarker combination were carried out separately and independently in each of the complications (ADHF and RTI). Briefly, PanelomiX uses the iterative combination of biomarkers and thresholds method to select thresholds for each biomarker that provide the optimal classification performance and studies the robustness of the constructed panels through receiver operating characteristic (ROC) curves and cross-validation, performing a 10-fold cross-validation. After the 10-fold cross-validation and for the evaluation of the performance, ROC curves of the cross-validation are built as the mean of centered predictions over the 10 cross-validation folds. Then, the ROC curve is compared through De Long's method with the cross-validation of the individual biomarkers.

To evaluate the additional value of the selected biomarker combination to the logistic regression models with the clinical predictors, De Long's method was used to compare areas under the curve of ROC curves. An internal validation of the constructed logistic regression models was performed through a 10-fold cross-validation with 3 repeats, evaluating the same parameters than in the cross-validation performed by PanelomiX. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant in all tests.

RESULTS

Nine hundred thirty-eight patients experiencing ischemic stroke from the Stroke-Chip study were included in this analysis. ADHF occurred in 19 of these patients (2%) and RTI in 86 patients (9.1%). Nine patients were noted with both complications. Patients with 1 or both complications were older, had higher rates of atrial fibrillation, higher baseline National Institute of Health Stroke Scale score, and higher previous modified Rankin scale score. Higher rates of in-hospital mortality and 3-month disability (Table 1) were also reported in these groups of patients. Patients with ADHF also had higher rates of coronary disease, and patients with RTI had higher values of admission glycemia.

Among the analyzed molecules, patients with ADHF had higher plasma levels of D-dimer, NT-proBNP, tumor necrosis factor receptor-1, and vascular adhesion protein-1 than those without this complication, whereas patients with RTI had higher levels of D-dimer, endostatin, interleukin-6, NT-proBNP, and vWF compared with

patients without this complication. The values of each biomarker and the clinical variables are reported in Table 1.

A panel including vascular adhesion protein-1 >5.67, NT-proBNP >4.98, and D-dimer >5.38 was selected by the PanelomiX software as the most accurate for the prediction of ADHF. The panel was positive when any 1 of the markers was above the cutoff (specificity, 71.5%; sensitivity, 89.5%). For the prediction of RTI, the software selected a panel including interleukin-6 >3.97, vWF >3.67, and D-dimer >4.58. In this case, the panel was positive when at least 2 of the markers were above the cutoff (specificity, 59.8%; sensitivity, 82.9%) (Figure 1). Of the 9 patients with both complications, 7 were positive for both panels, 1 patient was positive for only the RTI panel, and the other patient was negative for both panels.

Two different binary logistic regression models were developed, one for each complication. The selected biomarker panels independently predicted ADHF and RTI, respectively (odds ratio [OR], 11.859 [95% CI, 2.67–53.74], *P*=0.001 for ADHF; OR, 3.73 [1.95–7.15], *P*<0.0001 for

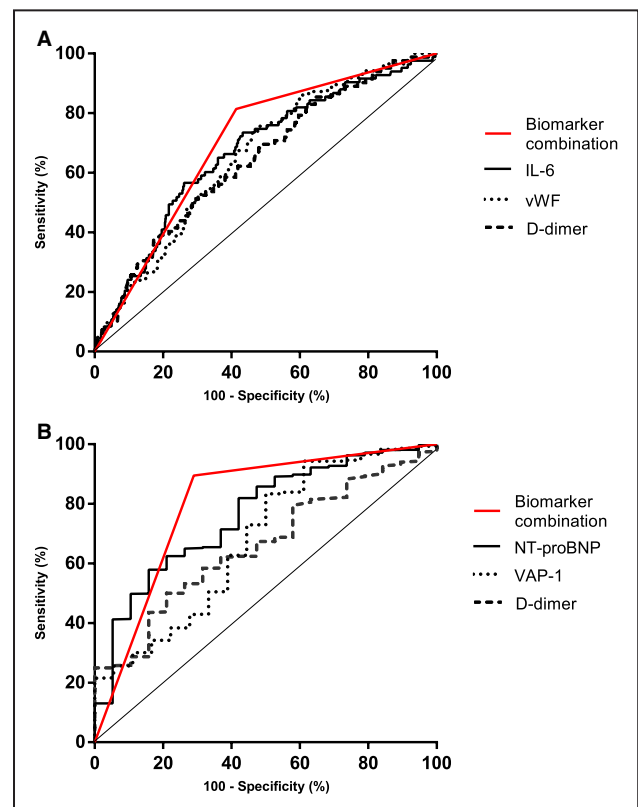


Figure 1. ROC curves of the biomarkers alone and in combination for each complication.

A, ROC curve for RTI biomarkers panel (black line), D-dimer (dotted line), vWF (gray) and interleukin-6 (dashed line). **B**, ROC curve for ADHF biomarker panel (black line), VAP-1 (dotted line), NT-proBNP (gray line), and D-dimer (dashed line). ADHF indicates acute decompensated heart failure; IL-6, interleukin-6; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; ROC, receiver operating characteristic; RTI, respiratory tract infection; VAP-1, vascular adhesion protein-1 and vWF, von Willebrand factor.

Table 2. Logistic Regression Analyses and Additional Predictive Value of Blood Biomarkers for ADHF and RTI

	ADHF		RTI	
	Clinical Model	Clinical Model+Biomarkers Panel	Clinical Model	Clinical Model+Biomarkers Panel
Logistic regression, OR				
NIHSS at admission	1.09 (1.02–1.16), $P=0.006^*$	1.06 (1–1.14), $P=0.048^\dagger$	1.12 (1.09–1.16), $P<0.0001^\ddagger$	1.10 (1.07–1.14), $P<0.0001^\ddagger$
Age	1.04 (0.99–1.11), $P=0.07$	1.02 (0.98–1.08), $P=0.26$	1.02 (1–1.04), $P=0.02^\dagger$	1.01 (0.99–1.03), $P=0.2$
Coronary disease	3.24 (1.18–8.44), $P=0.02^\dagger$	2.8 (1.01–7.36), $P=0.047^\dagger$
Sex, female	1.36 (0.5–3.83), $P=0.52$	1.16 (0.43–3.26), $P=0.76$	0.8 (0.51–1.35), $P=0.38$	0.8 (0.5–1.3), $P=0.37$
Biomarker combination	...	10.1 (3–52.2), $P<0.0001^\ddagger$...	3.73 (2.06–6.75), $P<0.0001^\ddagger$
ROC curve				
AUC	0.80 (0.70–0.88)	0.88 (0.83–0.93)	0.78 (0.73–0.82)	0.81 (0.77–0.88)
De Long test	...	$P=0.038^\dagger$...	$P=0.048^\dagger$
Cross-validation AUC	0.79 (0.72–0.87)	0.87 (0.82–0.92)	0.78 (0.74–0.83)	0.82 (0.78–0.85)
De Long test	...	$P=0.02^\dagger$...	$P=0.002^*$

The table represents the comparison between predictive models, with or without biomarker combinations. For logistic regression models, OR (95% CI) and P values are given. For the evaluation of the performance of the models, the AUC (95% CI) of the models without doing cross-validation and carrying out a 10-fold cross-validation is represented. AUC indicates area under the curve; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; OR, odds ratio; and ROC, receiver operator characteristic.

* $P<0.01$.

† $P<0.05$.

‡ $P<0.001$.

RTI) after adjusting by selected clinical variables (Table 2). Age, sex, and National Institute of Health Stroke Scale were selected as confounders in both models because of their influence in the development of both complications.¹² In case of ADHF, coronary disease was also added to the model, as it has been reported as a risk factor for ADHF.¹³ Multicollinearity was not detected in any of the models. The addition of the biomarker panels to the logistic regression models improved the accuracy of the clinical model for both complications in terms of area under the curve, from 0.80 (95% CI, 0.70–0.88) to 0.88 (95% CI, 0.83–0.93) ($P=0.038$) in ADHF and; from 0.78 (95% CI, 0.73–0.82) to 0.81 (95% CI, 0.77–0.88) ($P=0.048$) in the case of RTI (Table 2).

These increments of the area under the curve when adding the biomarker combinations to the clinical models were also observed after the internal validation of these results through a 10-fold cross-validation. The results of the cross-validation are shown in Table 2, and all the ROC curves are represented in Figure 2.

DISCUSSION

The present study demonstrates that the occurrence of 2 common post-stroke complications during hospitalization, ADHF and RTI, could be predicted at admission by using 2 different biomarker panels in combination with clinical factors.

The use of blood biomarkers for the prediction of post-stroke complications has generated increasing

research in the past years.^{14,15} However, individual markers tested so far have not demonstrated enough predictive accuracy to be implemented in clinical practice. In this article, rather than testing individual markers, we tested automatically derived biomarker panels, which might be complementary tools to achieve a better prediction.¹⁶ In fact, biomarker panels might be more valuable to reflect the complexity of the disease and its consequences, with several impaired biological pathways that might be reflected by automatically selected biomarkers. In fact, we obtained 2 different biomarker panels with individual markers from diverse pathways implicated in stroke and post-stroke complications.

Of the biomarkers proposed for the ADHF prediction after stroke, NT-proBNP has been widely associated with the diagnosis of ADHF.¹⁷ Vascular adhesion protein-1, a marker of endothelial dysfunction, has also been related with congestive HF, being elevated in these patients when compared with controls,¹⁸ and an independent prognostic marker for mortality in chronic HF patients.¹⁹ D-dimer is a product of fibrin degradation. In healthy subjects, high levels of D-dimer have been associated with incident HF with reduced ejection fraction.²⁰ Moreover, in patients with known HF, higher levels of D-dimer predicted mortality and incident atrial fibrillation.²¹

The proteins from the RTI biomarker panel are more related with the acute phase. An increase in the levels of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in patients with stroke-associated pneumonia has been

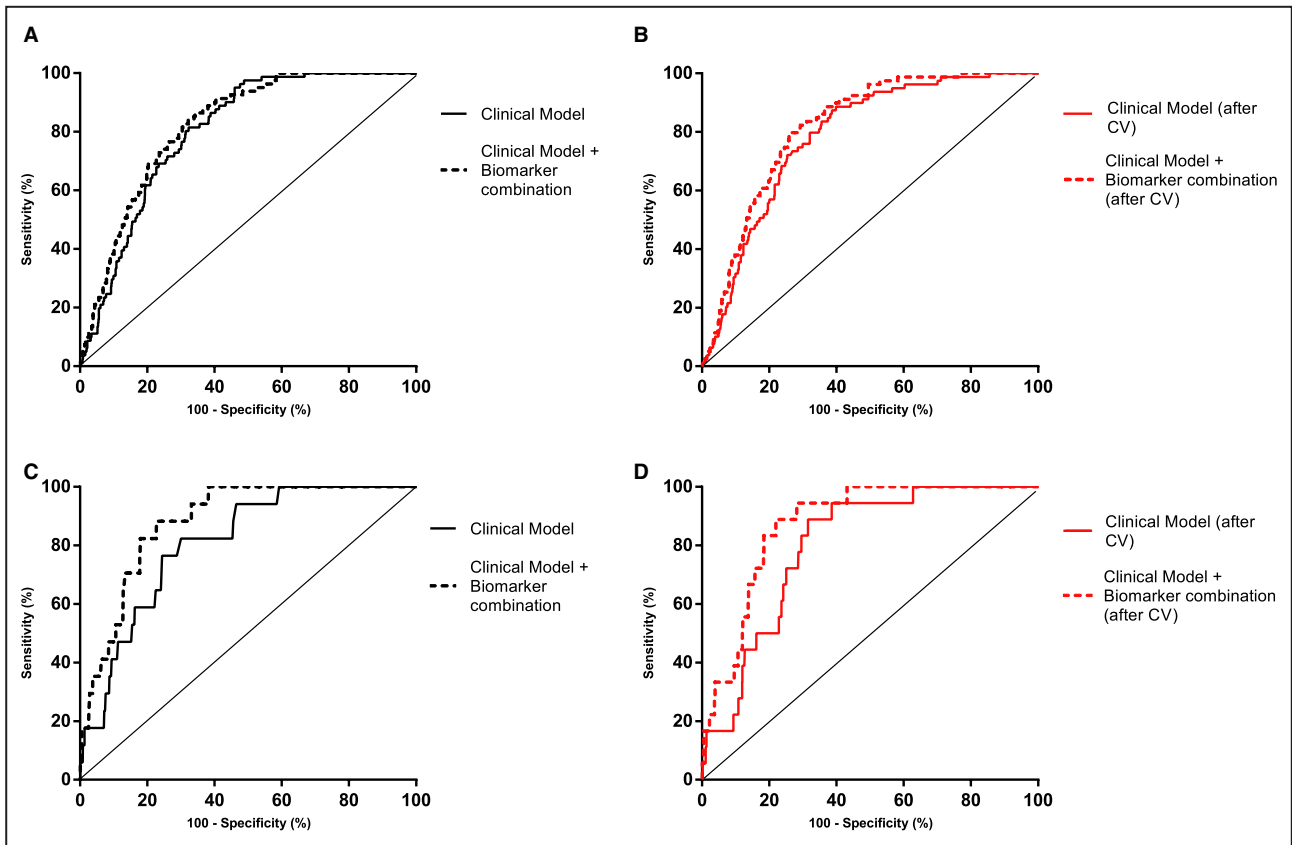


Figure 2. Performance of the constructed models for the 2 complications.

A and **B** represent the performance of the models constructed for RTI, and **C** and **D** represent the performance of the models constructed for ADHF. **A**, ROC curve overlapping the clinical model and the clinical model plus the biomarker combination for RTI. The AUC increase is significant ($P=0.048$). **B**, ROC curve overlapping the clinical model and the clinical model plus the biomarker combination for RTI after the cross-validation. The AUC increase is significant ($P=0.002$). **C**, ROC curve overlapping the clinical model and the clinical model plus the biomarker combination for ADHF. The AUC increase is significant ($P=0.038$). **D**, ROC curve overlapping the clinical model and the clinical model plus the biomarker combination for RTI after the cross-validation. The AUC increase is significant ($P=0.02$). ADHF indicates acute decompensated heart failure; AUC, area under the curve; ROC, receiver operating characteristic; and RTI, respiratory tract infection.

reported,^{22–24} which can predict the risk of stroke-associated infections and mortality. Regarding the other 2 biomarkers of the panel, D-dimer has been associated with community-acquired pneumonia. Increased plasma levels of this molecule were correlated with the severity of the disease.²⁵ vWF is the only protein that has not been related with RTIs previously. Its major biological functions are related with adhesion of platelets and factor VII protection.²⁶ But in the past years, new functions of this molecule have emerged. Interactions between platelets and bacterial infections have been reported,²⁷ as well as the role of vWF with the immune cells, as leukocyte extravasation.²⁸

Our results, if confirmed, might have clinical implications. We propose 2 different biomarker panels that could predict at admission the appearance of ADHF and RTI after stroke. Both biomarker panels have a high sensitivity, resulting in a detection of most of the true-positive patients. After stroke onset, predicting these 2 complications could help clinicians to monitor

and treat these 2 kinds of patients as early as possible. Consequently, with these 2 biomarker combinations in clinical practice and the adequate tools to treat these patients, there could be a reduction of the in-hospital length of stay or even a decrease in mortality. In the case of RTI, there is no evidence that antibiotic prophylaxis prevents the onset of these infections or reduces the mortality of these patients,²⁹ but whether selective antibiotic prophylaxis in high-risk patients or alternative prophylactic measures such as immunomodulatory therapies are effective is being studied.

As mentioned in the introduction, dyspnea is a common symptom of ADHF and RTI, and this can sometimes delay the diagnosis of the complication. We suggest that these 2 biomarker combinations could also be useful for the differentiation of both diseases, and clinicians would have additional tools for an early diagnosis or treatment. But to confirm this hypothesis, a prospective study measuring these markers in patients with dyspnea should be performed.

The study has certain limitations. First, the fact that data were collected by reviewing clinical registries might lead to some missing data. In fact, the incidence of ADHF in our study is much lower than reported. Second, the low number of events in the case of ADHF, even after the use of Firth correction, leads to wide CIs for the combination of blood biomarkers, making these results less reliable. Third, data on previous history of HF were not available and, therefore, we cannot rule out whether the predictive value of the biomarker panels might be modified by the existence of previous HF. Likewise, relevant data related to RTI were also not available, such as dysphagia or severe facial palsy at admission. An external validation or replication of our results has not been possible because of the inability to obtain a large cohort of stroke patients with acute blood samples. Furthermore, the clinical value added by the biomarkers combination in the clinical models is rather low. In addition, the use of study-derived cut-off points for biomarker measurement, even when is automatically selected by the PanelomiX software and not driven by the investigators, might overestimate the precision of our observations. However, given the preliminary nature of the present study, the selected cutoffs might serve as a reference for replication purposes in further studies. Finally, the measured biomarkers had other intended uses; therefore, our scores might be improved using other biomarkers more related to our end points such as C-reactive protein,³⁰ procalcitonin,³¹ or serum amyloid A for RTI³² or midregional proatrial natriuretic peptide, troponin, interleukin-1 receptor–like 1 or galectin-3 for ADHF.¹⁷

These limitations confer to our study a hypothesis-generating nature, and future studies are needed to establish the practical usefulness of those markers. These future prospective studies should include patients experiencing stroke at admission, collecting data of cardiac and respiratory symptoms, and, ideally, serial measurements of the biomarker panels in all included patients, to determine the specificity and sensitivity of each combination for the prediction between both complications. Dyspnea should also be reported, to explore the capacity of the biomarker combinations to differentiate between the 2 conditions in these patients. The measurement of specific biomarkers of each complication, as the commented in the previous paragraph, might help to improve the prediction capacity of the panels.

CONCLUSIONS

In conclusion, blood biomarkers could be useful for the early prediction of 2 of the major complications during the in-hospital stay of stroke patients: ADHF and RTI.

Future studies should focus on the validation of these results as well as the discriminative power of the panels in patients with dyspnea.

ARTICLE INFORMATION

Received August 25, 2020; accepted January 11, 2021.

Affiliations

From the Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain (J.F., A.B., T.G., O.V., J.M.); Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain (A.B., M.M., M.H., A.D.); Stroke Unit, Hospital Universitari Verge de la Cinta de Tortosa, Tortosa, Spain (S.R., J.Z.); Department of Neurology, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña Biomedical Research Institute, Spain (M.C.); Stroke Unit, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain (B.L., P.C.); Stroke Unit, Hospital Universitari Josep Trueta, Girona, Spain (C.v.E., J.S.); Stroke Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain (E.L.); Department of Neurology, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain (D.C.); and Stroke Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain (M.R.).

Acknowledgments

Author contributions: Drs Bustamante, Dávalos, and Montaner conceived the study. Drs Bustamante, López-Cancio, and García-Berrocó managed the study. Drs Bustamante, Reverté, Millán, Castellanos, Lara-Rodríguez, Zaragoza, Hernández-Pérez, Eendenburg, Cardona, López-Cancio, Cánovas, Serena, and Rubiera acquired the data. J. Faura and O. Ventura performed the statistical analysis. J. Faura and Drs Bustamante, López-Cancio, and Montaner interpreted the data. J. Faura drafted the manuscript. All authors performed a critical review of the manuscript.

Sources of Funding

This project received funding from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [DTS14/00004, PI17/02130], co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER), and from Fundació La Marató de TV3 [201706] and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program [754517]. Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network INVICTUS+ (RD16/0019/0021). The funders had no role in the study design and conduction.

Disclosures

None.

REFERENCES

1. Béjot Y, Bailly H, Durier J, Giroud M Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse Med*. 2016;45:e391–e398. DOI: 10.1016/j.lpm.2016.10.003.
2. Kumar S, Selim MH, Caplan LR Medical complications after stroke. *Lancet Neurol*. 2010;9:105–118. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70266-2.
3. Bustamante A, Giral D, García-Berrocó T, Rubiera M, Álvarez-Sabin J, Molina C, Serena J, Montaner J The impact of post-stroke complications on in-hospital mortality depends on stroke severity. *Eur Stroke J*. 2017;2:54–63. DOI: 10.1177/2396987316681872.
4. Gheorghiadu M, Pang PS Acute heart failure syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:557–573. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.10.041.
5. Burkot J, Kopec G, Pera J, Slowik A, Dziedzic T Decompensated heart failure is a strong independent predictor of functional outcome after ischemic stroke. *J Card Fail*. 2015;21:642–646. DOI: 10.1016/j.cardfail.2015.03.008.
6. Badve MS, Zhou Z, van de Beek D, Anderson CS, Hackett ML Frequency of post-stroke pneumonia: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Stroke*. 2019;14:125–136. DOI: 10.1177/1747493018806196.
7. Teh WH, Smith CJ, Barlas RS, Wood AD, Bettencourt-Silva JH, Clark AB, Metcalf AK, Bowles KM, Potter JF, Myint PK Impact of stroke-associated pneumonia on mortality, length of hospitalization, and functional outcome. *Acta Neurol Scand*. 2018;138:293–300. DOI: 10.1111/ane.12956.

8. Bustamante A, López-Cancio E, Pich S, Penalba A, Giral D, García-Berrococo T, Ferrer-Costa C, Gasull T, Hernández-Pérez M, Millan M, et al. Blood biomarkers for the early diagnosis of stroke: the Stroke-Chip study. *Stroke*. 2017;48:2419–2425. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017076.
9. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, Jaffe AS, Jneid H, Kelly RF, Kontos MC, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non–ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;130:2354–2394. DOI: 10.1161/CIR.000000000000133.
10. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36:309–332. DOI: 10.1016/j.ajic.2008.03.002.
11. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M PanelomiX: a threshold-based algorithm to create panels of biomarkers. *Transl Proteomics*. 2013;1:57–64. DOI: 10.1016/j.trprot.2013.04.003.
12. Smith CJ, Bray BD, Hoffman A, Meisel A, Heuschmann PU, Wolfe CDA, Tyrrell PJ, Rudd AG Can a novel clinical risk score improve pneumonia prediction in acute stroke care? A UK multicenter cohort study. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:1–9.e001307. DOI: 10.1161/JAHA.114.001307.
13. Lala A, Desai AS The role of coronary artery disease in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2014;10:353–365. DOI: 10.1016/j.hfc.2013.10.002.
14. Bustamante A, Díaz-Fernández B, Pagola J, Blanco-Grau A, Rubiera M, Penalba A, García-Berrococo T, Montaner J Admission troponin-I predicts subsequent cardiac complications and mortality in acute stroke patients. *Eur Stroke J*. 2016;1:205–212. DOI: 10.1177/2396987316654337.
15. Zapata-Arriaza E, Mancha F, Bustamante A, Moniche F, Pardo-Galiana B, Serrano-Gotarredona P, Navarro-Herrero S, Pallisa E, Faura J, Vega-Salvatierra Á, et al. Biomarkers predictive value for early diagnosis of Stroke-Associated Pneumonia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6:1882–1887. DOI: 10.1002/acn3.50849.
16. Adamcova M, Šimko F Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases perspective. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39:1068–1072. DOI: 10.1038/aps.2018.29.
17. Mallick A, Januzzi JL Jr Biomarkers in acute heart failure. *Rev Esp Cardiol*. 2015;68:514–525.
18. Boomsma F, Van Veldhuisen DJ, De Kam PJ, Man In 'T Veld AJ, Mosterd A, Lie KI, Schalekamp MADH Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 1997;33:387–391. DOI: 10.1016/S0008-6363(96)00209-X.
19. Boomsma F, De Kam PJ, Tjeerdsma G, Van Den Meiracker AH, Van Veldhuisen DJ Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) is an independent prognostic marker for mortality in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2000;21:1859–1863. DOI: 10.1053/euhj.2000.2176.
20. de Boer RA, Naylor M, deFilippi CR, Enserro D, Bhambhani V, Kizer JR, Blaha MJ, Brouwers FP, Cushman M, Lima JAC, et al. Association of cardiovascular biomarkers with incident heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *JAMA Cardiol*. 2018;3:215–224. DOI: 10.1001/jamacardio.2017.4987.
21. Wannamethee SG, Whincup PH, Papacosta O, Lennon L, Lowe GD Associations between blood coagulation markers, NT-proBNP and risk of incident heart failure in older men: the British Regional Heart Study. *Int J Cardiol*. 2017;230:567–571. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.12.056.
22. Kwan J, Horsfield G, Bryant T, Gawne-Cain M, Durward G, Byrne CD, Englyst NA IL-6 is a predictive biomarker for stroke associated infection and future mortality in the elderly after an ischemic stroke. *Exp Gerontol*. 2013;48:960–965. DOI: 10.1016/j.exger.2013.07.003.
23. Hoffmann S, Harms H, Ulm L, Nabavi DG, Mackert B-M, Schmehl I, Jungehülsing GJ, Montaner J, Bustamante A, Hermans M, et al. Stroke-induced immunodepression and dysphagia independently predict stroke-associated pneumonia—The PREDICT study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37:3671–3682. DOI: 10.1177/0271678X16671964.
24. Bustamante A, Sobrino T, Giral D, García-Berrococo T, Llombart V, Ugarriza I, Espadaler M, Rodríguez N, Sudlow C, Castellanos M, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2014;274:215–224. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.07.015.
25. Arslan S, Ugurlu S, Bulut G, Akkurt I The association between plasma D-dimer levels and community-acquired pneumonia. *Clinics*. 2010;65:593–597. DOI: 10.1590/S1807-59322010000600006.
26. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ Von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol*. 2012;128:158–169. DOI: 10.1159/000339426.
27. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Chabert A, Pozzetto B, Cognasse F, Giraud O Platelets and infections—complex interactions with bacteria. *Front Immunol*. 2015;6:1–18.
28. Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, Goerge T, Schneider SW, Jones C, Nieswandt B, et al. Von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood*. 2010;116:4712–4719. DOI: 10.1182/blood-2010-03-276311.
29. Badve MS, Zhou Z, Anderson CS, Hackett ML Effectiveness and safety of antibiotics for preventing pneumonia and improving outcome after acute stroke: systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27:3137–3147. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.07.001.
30. Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, Sánchez-Poblet J, García-Berrococo T, Giral D, Fluri F, Topakian R, Worthmann H, Hug A, et al. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis. *J Neurochem*. 2017;141:305–314. DOI: 10.1111/jnc.13973.
31. Fluri F, Morgenthaler NG, Mueller B, Christ-Crain M, Katan M Copeptin, procalcitonin and routine inflammatory markers—predictors of infection after stroke. *PLoS One*. 2012;7:e48309. DOI: 10.1371/journal.pone.0048309.
32. Azurmendi L, Lapierre-Fetaud V, Schneider J, Montaner J, Katan M, Sanchez JC Proteomic discovery and verification of serum amyloid A as a predictor marker of patients at risk of post-stroke infection: a pilot study. *Clin Proteomics*. 2017;14:14–27. DOI: 10.1186/s12014-017-9162-0.

Stroke-induced immunosuppression: implications for the prevention and prediction of post-stroke infections. *Faura et al. J Neuroinflammation. 2021; 18:127*

REVIEW

Open Access



Stroke-induced immunosuppression: implications for the prevention and prediction of post-stroke infections

Júlia Faura¹, Alejandro Bustamante^{2*}, Francesc Miró-Mur³ and Joan Montaner^{1,4}

Abstract

Stroke produces a powerful inflammatory cascade in the brain, but also a suppression of the peripheral immune system, which is also called stroke-induced immunosuppression (SIIS). The main processes that lead to SIIS are a shift from a lymphocyte phenotype T-helper (Th) 1 to a Th2 phenotype, a decrease of the lymphocyte counts and NK cells in the blood and spleen, and an impairment of the defense mechanisms of neutrophils and monocytes. The direct clinical consequence of SIIS in stroke patients is an increased susceptibility to stroke-associated infections, which is enhanced by clinical factors like dysphagia. Among these infections, stroke-associated pneumonia (SAP) is the one that accounts for the highest impact on stroke outcome, so research is focused on its early diagnosis and prevention. Biomarkers indicating modifications in SIIS pathways could have an important role in the early prediction of SAP, but currently, there are no individual biomarkers or panels of biomarkers that are accurate enough to be translated to clinical practice. Similarly, there is still no efficient therapy to prevent the onset of SAP, and clinical trials testing prophylactic antibiotic treatment and β -blockers have failed. However, local immunomodulation could open up a new research opportunity to find a preventive therapy for SAP. Recent studies have focused on the pulmonary immune changes that could be caused by stroke similarly to other acquired brain injuries. Some of the traits observed in animal models of stroke include lung edema and inflammation, as well as inflammation of the bronchoalveolar lavage fluid.

Keywords: Stroke, Immunosuppression, Biomarkers, Inflammation, Infection, Pneumonia

Background

Stroke-induced immunosuppression (SIIS) is a set of processes that lead to a peripheral suppression of the immune system after the occurrence of stroke. One of the main and direct consequences of this SIIS is that it makes stroke patients more susceptible to bacterial infections. Stroke-associated infections (SAIs) represent one of the major complications post-stroke, which worsens the functional outcome of patients and increases their mortality rates [1]. Approximately 30% (24–36%) of patients develop

infections after stroke, with pneumonia and urinary tract infections (UTI) being the most common forms, both having a frequency of 10% [2].

Among these infections, stroke-associated pneumonia (SAP) is usually the most acute type of SAI and has the worst impact on functional outcome [3]. It increases mortality for up to 1 year, prolongs hospital stays, and worsens the functional outcome at discharge [4]. The clinical definition of pneumonia after stroke has differed in many studies in both the terminology and the diagnosis of the complication [5]. To address this issue, the Pneumonia in Stroke Consensus (PISCES) Group proposed the term SAP, to encompass all terms referring to lower respiratory tract infections in stroke patients

* Correspondence: abustamante.germanstrias@gencat.cat

²Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

within the first 7 days after stroke onset [6]. In the same publication, new diagnostic criteria were proposed based on the criteria for the definition of healthcare-associated infection from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) of the United States of America, which were the most used criteria by that point [7]. However, SAP assessment is still challenging, especially due to the limited role of chest radiography. For this, chest computed tomography has been proposed as a complement to PISCES criteria in the screening of SAP in stroke patients. In a small cohort, thorax high-resolution computed tomography (THRCT) was able to differentiate between bronchopneumonia and other low respiratory tract infections in SAP patients, demonstrating a high accuracy in the diagnosis of SAP [8]. More recently, Kishore et al. [9] have also addressed this issue, but they have observed that conventional chest X-rays have limited accuracy for the diagnostic of SAP when compared with THRCT. Similarly, they found in their work some discrepancies between PISCES criteria and THRCT. Larger studies, including perhaps serial imaging, are needed in this field, to validate whether PISCES criteria and THRCT might be combined for the diagnosis of SAP.

Nowadays, the clinical strategies against SAP are based on wide-spectrum antibiotics once an infection is diagnosed through clinical criteria, along with prevention by dysphagia screening in stroke units. Recently, the PISCES consortia launched a recommendation for a standardized approach to antibiotic therapy in post-stroke pneumonia [10]. Nonetheless, early treatment before the development of clinical signs could prevent the onset of SAP or ameliorate its consequences. This would have benefits for patients and saving also a great number of resources for health care systems [11]. Several clinical trials have explored this idea through the administration of prophylactic antibiotics to acute stroke patients. However, the meta-analysis performed by Vermeij et al. [12] showed that preventive antibiotics neither reduce the risk of pneumonia nor the risk of death or poor outcome after stroke. The treatment did reduce the occurrence of overall infections and UTIs, but did not show any effect regarding the occurrence of SAP. These results were translated into recommendations against the routine use of prophylactic antibiotics in stroke guidelines.

In addition, antibiotics can have both protective and detrimental effects on the central nervous system (CNS) and could have modulatory effects on the immune system. The administration of antibiotics affects human bacterial communities and may lead to a dysbiosis of intestinal microbiota, which could remain altered for 6 months after antibiotic therapy [13]. Studies in mice living in germ-free conditions showed the importance of gut microbiota in the development and function of the CNS. These germ-free mice developed brain diseases

that were replicated in antibiotic-depleted microbiota animals [14]. In experimental stroke, it has been observed that the depletion of gut microbiota by antibiotics worsens the outcome of the ischemic mice, decreasing their survival, and developing acute colitis [15]. However, Benakis et al. found that antibiotic-induced alterations in the gut microbiota decreased ischemic injury in the brain. Concretely, dysbiosis reduced the trafficking of effector T cells from the gut to leptomeninges after stroke. In the brain, these cells enhance neuroinflammation [16]. Further studies are needed to elucidate the effects and interaction of antibiotics with stroke, to determine the impact of the antibiotic treatment in the brain lesion in SAI patients.

The failure of these clinical trials could make the stroke units rethink therapeutic strategies for SAP prevention or early treatment. Diverse reasons might be responsible for the lack of success of these trials, such as the inclusion of patients with a relatively low risk for infection, the wrong choice of the antibiotic regime, or the time-window for patient inclusion. But another plausible explanation is that despite being useful for SAP treatment, antibiotics might not be effective in the prevention of SAP, thus opening a new opportunity for alternative preventive measures, with SIIS as an alternative therapeutic target.

Along these lines, immunomodulation of the peripheral immune system has also been explored as an alternative therapy for the prevention of these infections, but to a lesser extent than preventive antibiotics and mostly in experimental stroke. Developing new immunomodulating preventive therapies against the development of SAP will require a deep knowledge of the mechanisms that lead to SIIS and the resulting susceptibility of stroke patients to bacterial infections.

Hence, this review intends to present those mechanisms implicated in SIIS, focusing on which clinical implications these pathways could have, as the finding of biomarkers capable of predicting the onset of SAI and SAP and the use of immunomodulatory therapies (either systemic or local) to prevent them.

Cellular and molecular mechanisms of stroke-induced immunosuppression

After the occurrence of stroke, an activation of the inflammatory cascade due to the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) by the injured and dead cells causes a neuroinflammatory state in the brain. The release of inflammatory mediators, together with oxidative stress and other factors, increases the permeability of the brain-blood barrier (BBB), which in turn facilitates leukocyte infiltration into the brain [17].

Conversely, focusing on the peripheral immune system, immunosuppression has been reported early within

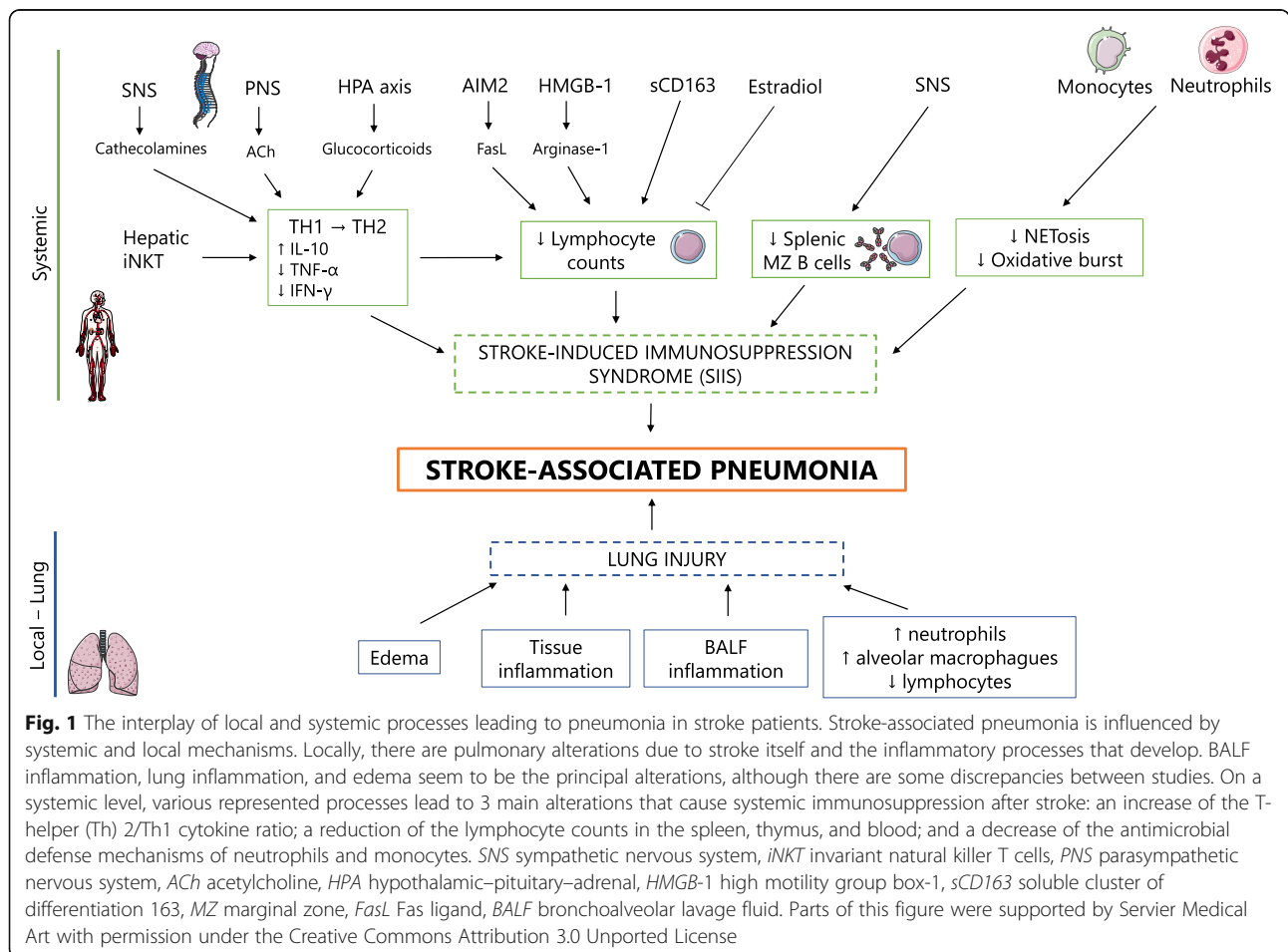
the first hours after stroke. One of the main processes of SIIS is the shift of the T cell response from a T-helper (Th) 1 response, characterized by the secretion of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ), to a T-helper 2 (Th2) anti-inflammatory response, with the secretion of interleukin (IL)-10 and IL-4 among others. An increased ratio of Th2-type cytokines over Th1-type cytokines characterizes this shift. Another characteristic trait of SIIS is the lymphocyte and splenic impairment, which consists mainly of lymphocytopenia in blood, spleen, and lymph nodes [18]. The molecular and cellular processes that drive to SIIS are described in this chapter, and summarized in Fig. 1.

Various studies have reported a decrease in the production of IFN- γ and the secretion of TNF- α in blood samples from mice whom underwent a middle cerebral artery occlusion (MCAO), as well as an increase of the circulating levels of IL-10 [18, 19]. IL-10 is a well-known anti-inflammatory cytokine that inhibits the production of TNF- α and IFN- γ [20]. A time-dependent increase in IL-10 as well as a decrease in TNF- α /IL-10 ratio was observed in stroke patients developing infection [18]. Jiang

et al. [21] observed the same pattern of circulating cytokine expression in human stroke patients. In the same study, they were able to locate this shift in the pattern of circulating cytokine expression, which could occur between days 1 and 3 after stroke.

As mentioned earlier, the shift from Th1 to Th2 is associated with a reduction in lymphocyte counts at the spleen, blood, and thymus. The decrease was observed in MCAO mice 12 h after surgery, and it is due to enhanced apoptosis in these organs [18]. Spleen atrophy characterized by a drastic loss of splenocytes due to apoptosis was observed at 4 days in experimental stroke [22]. In line with this, Yan and Zhang [19] observed a contraction of the spleen volume in MCAO rats beginning at 12 h after the occlusion. This reduction of the splenic volume has also been observed in humans [23, 24].

Although susceptibility to infection after stroke could be eased by SIIS, the latter may represent an evolved mechanism to prevent immune reactions, mainly auto-reactive immune responses against CNS molecular components by infiltrating lymphocytes. The efferent neuronal pathways through CNS regulates immune system are presented below.



SIIS is mediated by the autonomic nervous system

The shift from the Th1 response to the Th2 response seems to be led by the autonomic nervous system (ANS), especially the sympathetic nervous system (SNS). Catecholamines like epinephrine and norepinephrine are SNS mediators that are secreted when the SNS is activated. They act through β -adrenergic receptors of immune cells, suppressing Th1 activities and cellular immune responses through the inhibition of IFN- γ secretion and the stimulation of IL-10 production by immune cells, among other processes [25].

After MCAO surgery in mice, higher levels of metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) (metabolites of epinephrine and norepinephrine, respectively) were observed from 6 h after surgery until 2 weeks. Treating MCAO mice with the beta-blocker propranolol blocks the catecholaminergic receptors and partially inhibits the activation of the SNS in these animals. The effects of this blockade in the circulation were an increase of IFN- γ levels; a decrease of IL-10, MN, and NMN; and an increase of the splenic volume [19]. The inhibition of the SNS through propranolol has also been proven to reduce lymphocyte dysfunction and bacterial infections, as well as improve the survival of MCAO mice [18], thus supporting the relevance of the SNS in SIIS.

β -arrestin2 (ARRB2) has been studied to elucidate the endogenous factors and pathways of the SNS that are involved in SIIS. ARRB2 protein is involved in multiple pathways. Wang et al. [26] found elevated splenic levels of ARRB2 in MCAO rats and a correlation of the protein with sympathetic activity. They also observed dysfunction of splenic monocytes, which was reversed with ARRB2 deficiency in the same manner as propranolol. Hence, these results suggest ARRB2 as an effector of the SNS for the mediation of SIIS.

In fact, ARRB2 seems to be mediating a loss of splenic marginal zone B cells in MCAO animals. McCulloch et al. [27] demonstrated that stroke induces a substantial loss of splenic B cells, especially in those from the marginal B zone. This cell loss is causing impairment to some immune functions, such as those related with the early defense against bacterial microorganisms, and this is associated with spontaneous lung infections. The treatment with propranolol reversed these impairments and reduced the susceptibility to lung infections in MCAO mice.

It is well known that the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis increases after stroke, with an early increase in the concentrations of cortisol [28, 29]. In a similar manner to catecholamines, glucocorticoids stimulate the secretion of anti-inflammatory cytokines. Prass et al. [18] observed that the inhibition of the HPA axis through the glucocorticoid receptor blocker RU486 prevented lymphopenia, lymphocyte apoptosis, and monocyte dysfunction. However, it did not reduce

bacterial infections, unlike propranolol treatment. These results reveal a role of the HPA axis in SIIS, but perhaps not as pivotal as the SNS.

The other division of the ANS, the parasympathetic nervous system (PNS), also seems to play a part in SIIS. The vagus nerve and acetylcholine (ACh) suppress the secretion of proinflammatory cytokines through the binding of acetylcholine to the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) in activated macrophages. Specifically, the inhibition of TNF- α production in spleen is driven by ACh-producing T cells [30]. Engel et al. [31] observed a rapid increase of parasympathetic activity in experimental stroke mice through an analysis of heart rate variability and blood pressure. Moreover, MCAO surgery was performed on two types of mice: wild-type (WT) mice who suffered a vagotomy and $\alpha 7$ nAChR knockout (KO) mice. Both cases showed a decrease in the bacterial load of the lungs when compared with MCAO WT mice on day 3 after ischemia.

These results suggest that increased parasympathetic activity plays some role in the increased susceptibility to bacterial infections after stroke, possibly through the suppression of innate immune responses of the lungs due to the expression of $\alpha 7$ nAChR in activated lung macrophages and alveolar epithelial cells. The results obtained by Lafargue et al. [32] are in line with this hypothesis. They observed attenuation of the effect of stroke in lung injury and mortality when $\alpha 7$ nAChR was pharmacologically inhibited or genetically depleted in MCAO mice with pneumonia. Conversely, pretreatment with an $\alpha 7$ nAChR activator before MCAO surgery increased lung injury.

Other immunomediators of SIIS apart from ANS

The Th2/Th1 cytokine ratio is also favored by the hepatic invariant natural killer T (iNKT) cells, producing greater amounts of IL-10, but not IFN- γ . The direct immunomodulation of iNKT cells through the administration of a specific activator (α -galactosylceramide) in MCAO mice reduced stroke-induced neutrophil pulmonary influx, lung edema, and infections. This reduction was observed similarly in MCAO animals treated with propranolol [33].

A decrease in the lymphocyte proliferation also seems to cause the reduction of lymphocyte counts and could be partially explained by a release of arginase I (ArgI) from neutrophils. The enzyme ArgI is constitutively expressed in neutrophil granules, and its main function is to metabolize L-arginine into L-ornithine and urea. Higher levels of this enzyme were found in the blood of MCAO mice on day 4 after ischemia, and the supplementation of L-arginine in vitro in splenic T cells in the same animals restored T cell proliferation and increased IFN- γ production [34]. In humans, *ARG1* mRNA

expression and ArgI serum activity correlate with neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and stroke severity in stroke patients [35]. These two clinical parameters are associated with SAI [36, 37], thus suggesting a role of ArgI in immune dysfunction.

The release of ArgI could be mediated by high mobility group box 1 (HMGB1), a well-known DAMP, via the receptor of advanced glycation end-products (RAGE). Liesz et al. [38] found that this pathway seems to stimulate the production of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which could include neutrophils. They also observed that mice with RAGE deficiency after MCAO surgery had reduced splenic lymphocyte apoptosis and increased activated T cell counts. These results suggest that HMGB1 could stimulate the release of ArgI by MDSCs, in turn causing a decrease in leukocyte production.

Soluble CD163 (sCD163) is another molecule that seems to be implicated in the reduction of lymphocyte counts. CD163 is a receptor expressed in the membrane of monocytes and macrophages and is shed through matrix metalloproteinase ADAM17 into sCD163. O'Connell et al. [39] reported higher blood levels of sCD163 and ADAM17 in stroke patients, which negatively correlated with post-stroke lymphocyte counts. In vitro, the authors related the elevations of sCD163 with the suppression of lymphocyte proliferation.

Intense research is being conducted on new signaling pathways implicated in SIIS. Last year, a role of the cluster of differentiation (CD) 200-CD200R1 signaling axis in SIIS was identified. CD200R1 is an inhibitory immune receptor that is expressed in myeloid cells, and it has been observed that CD200R1-KO MCAO mice developed more spontaneous bacterial lung infections than WT MCAO mice, as well as lymphocytopenia and worse functional outcomes, among other effects [40]. These findings suggest that CD200-CD200R1 could be a therapeutic target for immunomodulating preventive therapies of SAI due to its possible protective role against them.

Another mechanism that seems to be implicated in the reduction of lymphocyte counts through the increase of T cell apoptosis is the activation of the AIM2 inflammasome-driven signaling cascade in monocytes [41]. This inflammasome is activated by sensing cell-free DNA, and through the secretion of IL-1 β , induces the expression of FasL in monocytes, leading to the T cell apoptosis. Inhibiting this pathway, Roth et al. have observed a reduction of bacterial infections after experimental stroke and an increase of the T cell survival.

Innate immune cells are also modified after stroke

Apart from lymphocytes, splenic NK cells have also been reported to undergo atrophy and a reduction in the

count after stroke, and this process is directly led by SNS and HPA [24]. In the same study, the administration of propranolol and RU486 significantly increased the NK-cell-mediated immune response against post-stroke pneumonia, which improved the mortality rates and reduced the bacterial burden in MCAO mice infected with *Listeria monocytogenes* (LM).

Some functions of the peripheral innate immune cells are altered after stroke, and they could also contribute to SIIS. The mechanisms related to bacterial killing, like oxidative burst and NETosis, are significantly impaired in the monocytes and neutrophils of stroke patients. This impairment was observed upon admission and normalized after day 5 for NETosis. In contrast, the inhibition of the oxidative burst persisted until day 7 [42].

Recently, it has also been described a reduced expression of CD11b in the neutrophils of stroke patients when compared with healthy controls. CD11b recognizes and binds to opsonized bacteria and facilitates the internalization of pathogens, among other functions, and it is considered a leukocyte activation marker [43]. However, in this same study, van Gemmeren et al. did not find an impairment of the neutrophil oxidative burst of stroke patients. The authors ascribe this finding to the small sample size.

Regarding monocytes, Li et al. [44] found overexpression of microRNA-4445 in this leukocyte type. This overexpression seems to be implicated in SIIS, as it causes a suppression of the tumor necrosis factor receptor-associated 4 (TRAF4)/inhibitor of kappa B alpha ($I\kappa B\alpha$)/nuclear factor kappa B (NF- κB) signaling pathway, activating, in turn, the expression of anti-inflammatory cytokines in monocytes.

Sex hormones play a part in SIIS

Differences between sexes in stroke have been observed in many studies, and male sex is a risk factor for its incidence and outcome. The difference between sexes seems to diminish with menopause among women, thus suggesting a neuroprotective role of endogenous estrogens against stroke. Male sex has been also described as a risk factor for SAP [45].

For this reason, experimental stroke studies and the study of SIIS are almost always performed with males. However, Zang et al. [46] performed a novel study on SIIS in female mice and described a protective role of estrogens (concretely, estradiol (E2)) in the peripheral immunosuppression of MCAO mice, which improved splenocyte counts. Furthermore, a similar protective role to that of E2 was observed for an agonist of G1: a synthetic agonist of the membrane estrogen receptor G protein-coupled receptor 30. This suggests a potential treatment for SIIS.

Regarding male sexual hormones, Dziennis et al. [47] reported an exacerbation of the peripheral immunosuppression in castrated MCAO mice that were treated with dihydrotestosterone (DHT) replacement. The authors described the role of DHT as a peripheral immunosuppressor following stroke.

Altogether, these antagonistic roles of the sex hormones in immunosuppression could be involved in the fact that male patients have a higher risk of suffering SAP. However, it is also needed to take into account that most women who undergo a stroke are postmenopausal, so these differences among sexes could be lower than expected.

Clinical implications (1): the use of cellular and molecular changes as biomarkers for the prediction of stroke-associated infections

As mentioned in the “Background” section, there is a lack of preventive therapies for SAI and SAP in clinical practice. The patient selection could be one of the reasons for the failure of the clinical trials with prophylactic antibiotics. Nowadays, apart from dysphagia screening, there are no routine measures to identify patients who have the highest risk of experiencing SAI in clinical practice. The ability to select such patients could represent an improvement in the experimental design of future clinical trials, either with the administration of preventive antibiotics or through immunomodulation. For this reason, research on biomarkers for the prediction of SAI development has been active in the last decade. Different cell and molecular changes related to the mentioned pathways have been explored and could act as predictive biomarkers for SAI or SAP (table S1).

Cell counts

As a result of leukocyte recruitment to the brain, immunological changes can be observed in circulating immune cells, and systemic inflammation is observed after stroke. In the first hours following stroke, there is an exponential increase in the peripheral neutrophil count and a decrease in the circulating levels of lymphocytes [48]. Due to these changes in peripheral blood cells, different leukocyte counts are being studied as biomarkers in stroke research, such as white blood cell (WBC) count and, recently, the NLR. The leukocyte counts and ratios are easily detectable and they make the early determination a possibility, which means they could potentially be useful biomarkers.

WBC count was explored as a predictor of SAI, SAP, and UTI, and the results indicated it could be an independent predictor of these complications in acute stroke patients [49]. Higher levels of circulating NK cells within the first hours after stroke were observed in patients who developed SAI in a study with 59 participants [50].

NLR is a well-known marker of systemic inflammation. Higher levels of NLR have been found in SAP patients, and there seems to be an association between NLR levels and the severity of SAP [37].

Monocyte to high-density lipoprotein (HDL) cholesterol ratio (MHR) has emerged as a novel inflammation marker. In a recent study, Sun et al. [51] showed the value of MHR and monocyte count as predictors of SAP at admission in a study with more than 800 SAI patients.

Clinical routine and nutritional-related molecules

Blood biomarkers that are measured routinely in most patients in clinical practice are also good candidates for SAI prediction due to their accessibility, in a similar manner to leukocyte counts. In non-diabetic stroke patients, hyperglycemia upon admission was found to be independently associated with SAI, SAP, and UTI, as well as a poor functional outcome at 3 months after the stroke episode [52]. Rodriguez-Sanz et al. [53] showed an inverse correlation between HDL cholesterol levels and the development of SAI. After establishing a cut-off point for SAI prediction (38.5 mg/dl), higher HDL was significantly associated with a lower risk of developing SAI.

Biomarkers related to nutritional status have also been explored. Serum albumin levels were identified as an independent predictor of SAP in a cohort of 705 patients [54]. Furthermore, lower levels of serum prealbumin were associated with a greater risk of SAI in a smaller cohort of 104 ischemic stroke patients [55]. Huang et al. [56] recently found an association between lower levels of vitamin D and SAP. In this study, patients were divided into 3 categories according to their vitamin D status: deficiency (< 25 nmol/L), insufficiency (25–50 nmol/L), and sufficiency (> 50 nmol/L). Patients with vitamin D deficiency had a higher incidence of SAP than patients with vitamin D insufficiency and sufficiency. Moreover, when adjusting by cofounders, vitamin D remained an independent predictor of SAP.

Acute-phase reactants

C-reactive protein (CRP) has been widely used in clinical practice as an acute-phase marker, which is why it has been also studied deep in the field of SAI. Fluri et al. [49] investigated the role of CRP and other markers in SAI in more than 300 patients. They found that CRP is an independent predictor of SAI, both alone and in combination with clinical factors and other markers. Our group reviewed the studies related to CRP and SAI to date in a systematic review. CRP was observed to be an independent predictor of SAI, and there was an optimal time window between 24 and 48 h after stroke [57].

Serum amyloid A (SAA) is another acute phase-protein that has been associated with the prediction of SAI in a small cohort of patients [58] and was validated as an independent predictor in a recent study with two new cohorts with more than 250 participants each [59]. An association of SAA with SAP was observed in a different study, but in this case, the association was in combination with another marker, the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) [60]. When cut-off points were established, the combination of these two markers predicted SAP with high specificity and sensitivity at 48 h after stroke onset. Mid-regional proadrenomedullin (MR-proADM) was also associated with SAP but at an earlier time than the SAA/suPAR combination (24 h after stroke).

The relationship of suPAR and MR-proADM with SAI was first explored by Bustamante et al. [61] when evaluating various classical sepsis biomarkers as predictors of SAI. suPAR and MR-proADM were both found to be independent predictors of SAI but in two different cohorts with different time points for blood collection. MR-proADM was found to be an early predictor of SAI in a cohort of 78 patients (based on blood collection at the first 6 h after stroke onset). On the other hand, suPAR was found to be a predictor of SAI in a different cohort, where the time point of the collection was at 24 h after stroke.

Fluri et al. [49] explored procalcitonin (PCT) and copeptin jointly with WBC, and each one by itself was found to be an independent predictor of SAI, SAP, and UTI. Their combination, along with CRP and clinical variables, improved the prediction of infection in stroke patients. Recently, PCT and copeptin were studied as SAP predictors along with other biomarkers by pooling data from two clinical trials (PREDICT [62] and STRAWINSKI [63]). Of all the studied biomarkers, the results showed that only PCT and copeptin were independent predictors of SAP when adjusting for clinical variables such as dysphagia, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), hypercholesterolemia, and the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) at admission [64]. In contrast, at earlier time points, Hu et al. [65] did not find PCT to be useful for the prediction of SAP, only when the clinical suspicion of SAP is already high. In the STRAWINSKI clinical trial, PCT was used as a guide for prophylactic antibiotic therapy. The clinical trial was negative, and PCT was not a predictor of SAI in the study population [63].

Cytokines and immune-related molecules

Cytokines are important immune mediators in the post-stroke response, so they have been studied as predictors of SAI, including pro-inflammatory IL-6 and anti-inflammatory IL-10. Worthmann et al. [66] studied both,

along with lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CRP. The four proteins were measured at different time points in 56 stroke patients, and all of them were associated with SAI incidence at most of the time points, but only CRP and IL-10 were independent predictors of SAI at the earliest time point (6 h after stroke onset). In a different study, IL-6 was an independent predictor of SAI in a cohort of 82 stroke patients and was also associated with mortality [67]. In a meta-analysis, Bustamante et al. [68] reported an independent association of IL-6 with the overcoming of SAI, but the additional predictive value over clinical predictors of SAI was modest.

IL-10 has also been evaluated as a predictor of SAI in other studies. Chamorro et al. [69] reported that IL-10 and circulating monocytes are independent predictors of SAI in 110 stroke patients, and there were higher levels of IL-6 in patients who developed an infection. In line with these results, Ashour et al. [36] reported that IL-10 is an independent predictor of SAI at admission in a study on 60 patients after establishing a cut-off point. Salat et al. [70] explored various cytokines in SAI patients and assessed the role of IL-10, IL-13, and IFN- γ as independent predictors of SAI.

Another study also explored IFN- γ jointly with microRNA-21 (miRNA-21) in a cohort of 54 patients. miRNA-21 was demonstrated to be related to IFN- γ deficiency when it is increased. A significant increase in miRNA-21 levels and a significant decrease in IFN- γ were observed in the peripheral blood of patients who developed SAI, and there was a correlation between both molecules [71]. Another studied cytokine in this field is IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). IL-1ra was studied along with IL-10, cortisol, and lymphocyte count, and only IL-1ra was independently associated with the risk of infection in 112 stroke patients [72].

The expression of human leucocyte antigen-DR (HLA-DR) on peripheral monocytes has also been studied as a predictor of SAI and SAP. In the PREDICT study, HLA-DR was found as an independent predictor of SAP in the presence of dysphagia on day 1 after stroke [62]. Similar results were found by Zhang et al. [73] but focusing on SAI. Even though there was an increase of expression in SAI patients in comparison with non-SAI patients on days 4 and 6 after stroke and not earlier, the authors reported a predictive value of HLA-DR for the risk of infection after a stroke on days 1 and 2.

Others

The ANS seems to have a role in immunosuppression after stroke, as mentioned in the “[Clinical implications \(1\): the use of cellular and molecular changes as biomarkers for the prediction of stroke-associated infections](#)” section. Heart rate variability (HRV) reflects the activity of this system, so the possible role of HRV in the

prediction of SAI was explored by Günther et al. [74]. They found that HRV indices were able to predict the development of SAI before the onset of symptoms.

Suda et al. [75] investigated whether thyroid hormone levels at admission could be associated with the incidence of SAI. They found that lower levels of free triiodothyronine (FT3) were associated with an increased risk of developing SAI. This association remained significant after adjusting by clinical cofounders when establishing a cut-off point for FT3.

Limitations and future perspectives in biomarkers' studies

Even though multiple candidates have been studied as possible biomarkers for the prediction of SAI, SAP, or UTI development in stroke patients, as presented in this section, none of them have been proven to have enough predictive value to be used in clinical practice. This could be due to some limitations of these studies. First, only a few studies evaluated the additional predictive value of the biomarkers for the prediction of SAI or SAP. Second, some discrepancies among studies have been observed, perhaps due to the variability between them. The blood collection time might represent one of the most important issues. Usually, patients develop SAP within the first 2–3 days after stroke, so an early detection in the first hours is needed to predict the onset of the infection and to be able to develop therapies to prevent them. Furthermore, most of the biomarker studies have not been evaluated regarding a gold standard test for SAP diagnosis, as there is a lack of a gold standard test for the clinical diagnosis of SAP, and therefore, its diagnosis might differ between studies, hindering its reproducibility. For this reason, it is important to phenotype well all the patients, whether with chest tomography or other tools that could be developed in future studies.

Although none of the presented candidates had enough statistical power by itself to be translated to clinical practice, combining biomarkers with high sensitivity and high specificity could open up new possibilities for researchers. Future studies on SAI and SAP biomarkers should combine the discovery and study of new candidates with the screening of complementary candidates to find a combination with the highest specificity and sensitivity. Hence, more research needs to be done in this field to find a biomarker or combination thereof that could be used to make decisions for the administration of preventive therapies. Multicentric cohorts collecting blood at early time-points and following standardized criteria for pneumonia diagnosis are perhaps the desirable study design.

Clinical implications (2): moving immunomodulation towards brain recovery and protection against infections

Prophylactic antibiotic therapy does not seem to affect the functional outcomes or the mortality rate in stroke patients [76]. In previous sections, we hypothesized various reasons why antibiotic prophylaxis could not be effective for the prevention of SAP. Another possible explanation for this failure could be that the depletion of part of the gut microbiota by the antibiotics could be favoring the growth of more resistant and aggressive bacterial strains. This, in turn, could be promoting the appearance of pneumonia in stroke patients, not only because of the aspiration of digestive content but also due to the translocation of the gut microbiota to the lung, as has been suggested in experimental studies [77]. This translocation and the subsequent dissemination are mainly due to an impaired intestinal permeability after stroke. Thus, the need for alternative preventive therapies for SAI and SAP is vital, and intense research is being done in this field.

The “[Cellular and molecular mechanisms of stroke-induced immunosuppression](#)” section of this review presented the known pathways implicated in SIIS. Along with other clinical factors such as dysphagia, invasive procedures, and comorbidities, SIIS increases the susceptibility to infections in stroke patients [78]. This immunosuppressive response could be attenuated by modulating one or more of the mechanisms of SIIS at the acute phase of stroke, thus reducing the susceptibility of the patients to infection and decreasing the mortality of stroke patients derived from this complication.

In experimental stroke, immunomodulation has been explored as prophylactic therapy for SAI and SAP (Table 1). Several studies have studied the action of the β -adrenoreceptor blockers propranolol and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in experimental rodent models of stroke. They observed that the inhibition of the SNS reduced bacterial infection of the lungs and partially reestablished some of the mechanisms affected by SIIS [18, 19, 33, 79]. The blockade of the HPA axis has also been explored through the administration of the glucocorticoid receptor blocker RU486, which seemed to restore leukocyte counts but did not reduce bacterial lung infections in MCAO rodents [18, 33]. These studies were discussed in detail in the “[Cellular and molecular mechanisms of stroke-induced immunosuppression](#)” section.

It is worth mentioning that β -adrenoreceptor antagonists as propranolol seem to be neuroprotective, reducing infarct volumes and improving neurological scores when being administered after MCAO surgery [86]. Thus, β -blockers therapy after stroke could at the same

Table 1 Immunomodulating therapies to prevent stroke-associated pneumonia and infections

Mechanism of action	Reference	Drug	Time of administration	Type of study	Major findings
Inhibition of the SNS	Prass et al. 2003 [18]	Propranolol	Immediately before and also 4 and 8 h after MCAO.	Experimental (MCAO mice)	Prevention of lymphocyte apoptosis, lymphopenia, monocytic deactivation and changes in lymphocyte cytokine production; prevention of bacteremia and pneumonia; ↑ survival rates
	Wong et al. 2011 [33]	Propranolol and 6-OHDA	24 h after MCAO	Experimental (MCAO mice)	Reversion of the iNKT cell phenotype induced by MCAO; ↑ survival rates; ↓ bacterial load in blood, lungs, liver, and spleen
	Yan and Zhang 2014 [19]	Propranolol	Immediately before and also 4 and 8 h after MCAO.	Experimental (MCAO mice)	↓ serum levels of MN, NMN and IL-10; ↑ pro-inflammatory cytokines; ↑ spleen volume
	Deng et al. 2016 [79]	6-OHDA	3 days before MCAO	Experimental (MCAO rats)	Reversion of the expression of MHC class II; ↑ TNF- α and IFN- γ levels in LPS-stimulated macrophages in vitro; ↓ NF- κ B activation; ↑ β -arrestin2 expression
	Sykora et al. 2015 [80]	β 1-selective BBs, nonselective BBs	Before and after stroke	Clinical	↓ frequency of pneumonia; association of post-stroke BB treatment with mortality
	Maier et al. 2015 [81]	BBs (mainly metoprolol and bisoprolol)	Before and after stroke	Clinical	No differences in the risk of pneumonia; ↓ mortality.
Inhibition of the HPA axis	Maier et al. 2018 [82]	BBs	Before and after stroke	Clinical	No differences in the rates of pneumonia nor mortality
	Prass et al. 2003 [18]	RU486	24 h, 5 h, and immediately before MCAO	Experimental (MCAO mice)	Prevention of lymphocyte apoptosis, lymphopenia, and monocytic deactivation
Inhibition of the iNKT cells	Wong et al. 2011 [33]	α -GalCer	24 h after MCAO	Experimental (MCAO mice)	↑ systemic levels of IFN- γ ; ↓ stroke-induced neutrophil pulmonary influx and lung edema; ↓ bacterial load in blood, lungs, liver and spleen
Inhibition of CD147	Jin et al. 2019 [83]	CD147 antibody	4 h after MCAO	Experimental (MCAO mice)	↓ lung damage; ↓ lung leukocyte infiltration; ↓ plasma and lung IL-17A
Inhibition of PTEN	Guan et al. 2013 [84]	Bvp	24 h after MCAO	Experimental (MCAO mice)	↓ bacterial loads in lung of bvp-treated mice; restoration of akt activation in the lung; ↓ mortality
GM-CSF	Dames et al. 2018 [85]	Recombinant mGM-CSF	6, 30, and 54 h after MCAO	Experimental (MCAO mice)	↑ leukocyte counts in lung; ↑ WBC count; ↑ long-term outcome

Experimental and clinical studies are represented in this table. In the Major findings column, all the results are referred to the patients or animals treated with the immunomodulator agent in comparison with their respective non-treated controls. MCAO middle cerebral artery occlusion, NA non-annotated, 6-OHDA 6-hydroxydopamine, iNKT invariant natural killer T cells, NM metanephrine, NMN normetanephrine, IL-10 interleukin-10, MHC major histocompatibility complex, TNF- α tumor necrosis factor- α , IFN- γ interferon- γ , LBP lipopolysaccharide binding protein, BB beta blocker, α -GalCer α -Galactosylceramide, Bvp bisperoxovanadium, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

time attenuate brain injury and prevent suffering infections.

However, the action of β -blockers in the reduction of SAI and SAP in humans has been explored in various studies with different degrees of success. In a retrospective study, Sykora et al. [80] reported a reduction in stroke mortality and SAP ratio in stroke patients under β -blocker therapy, along with a reduction of the SAP ratio in patients with pre-stroke β -blocker therapy. However, Maier et al. [81] performed a prospective clinical trial and did not observe differences in the ratio of SAP between patients receiving the post-stroke β -blocker therapy and those that did not. The effect of β -blockers on major stroke patients was also studied, and they did

not reduce the incidence of SAP or SAI in this type of patient [82].

Experimental studies have explored other immunomodulation strategies as a preventive therapy for SAP. The inhibition of CD147 seems to reduce the lungs' susceptibility to bacterial infections in MCAO mice. The protein CD147 is expressed broadly in many leukocyte subtypes and is involved in some immune processes like T cell activation and Th17 cell differentiation. By inhibiting CD147, Jin et al. [83] observed attenuation of lung damage, increased IFN- γ levels in the lungs, and the modulation of leukocyte subpopulation changes in the lungs of MCAO mice. Another immunomodulatory therapy involving the inhibition of PTEN seemed to reduce

bacterial lung infections and mortality in MCAO mice, possibly through the restoration of the PI3K/Akt cascade in the lungs [84]. Systemic treatment with the pluripotent cytokine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was also explored as an immunomodulating therapy for the prevention of bacterial infections in experimental stroke. This treatment did not reduce the bacterial burden or mortality in MCAO mice, but it did augment antibacterial immune responses and improved the long-term neurological outcome [85].

There has been a lack of success in clinical trials on β -blockers, and there have been discrepancies among them. Furthermore, no other immunomodulation therapy has reached a human-based study phase. Thus, new approaches are needed to find therapeutic targets. Thus far, immunomodulation strategies regarding SAP and SAI prevention have been systemic, with a possible detrimental effect on the brain or other side effects. A local immunomodulation approach could be a new horizon for the discovery of new preventive therapies for SAP.

The lung as a possible target for new immunomodulatory therapies

One of these new possible targets could be the local lung defenses. The brain-lung crosstalk after acute brain injury is well known, in which the brain and lungs interact closely and bidirectionally. The occurrence of major pulmonary injuries has been observed after acute brain injury. In the case of stroke, patients can suffer other types of pulmonary injuries apart from pneumonia, such as acute lung injury (ALI). An ALI incidence of 22% has been reported in acute stroke patients [87], although the clinical phenotype is mild when compared with other forms of acute brain injury, such as severe traumatic brain injury (TBI) and subarachnoid hemorrhage. Pneumonia, ALI, acute respiratory distress syndrome, and neurogenic pulmonary edema have also been reported after these two conditions [88]. After TBI, a systemic immunosuppression similar to SIRS occurs, which increases the risk of nosocomial infections [89], along with other factors in these neurocritical patients, such as mechanical ventilation. Another reason why the lung could be a target for the local immunomodulation is that its epithelial permeability could be altered by stroke, similarly to the gut epithelium [90].

The mechanisms underlying this interaction between the brain and lungs are still not well understood, although a “double hit model” has been proposed. After an acute brain lesion, the first “hit” involves the secretion of pro-inflammatory cytokines in the brain, the alteration of the BBB permeability, and the activation of the CNS. This causes several systemic alterations that result in local damage to the peripheral organs, such as

the lungs, and make them more susceptible to bacterial infections. In turn, the organ damage could exacerbate brain damage [91].

A new approach in the research of preventive therapies for SAP could be derived from the exploration of the cellular and molecular modifications in the lungs after stroke that also contributes to the susceptibility to pneumonia. In a hypothetical scenario, the possible lung damage could be prevented through local immunomodulation, hence decreasing the susceptibility of stroke patients to SAP without hampering neurorestoration in the brain after stroke.

Samary et al. [92] studied this issue in a rat model of focal ischemia. Lung edema and inflammation were observed in ischemic rats, as well as ultrastructural changes in the lung parenchyma. Regarding cytokine levels, they observed increased expressions of TNF- α and IL-6 in the brain and plasma, as well as higher TNF- α levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Furthermore, the phagocytic capability of alveolar macrophages was decreased in stroke animals, along with alterations in different ventilatory parameters, such as the respiratory rate and volume tidal.

In a different study performed in MCAO mice, Austin et al. [93] observed lung inflammation in the animals, but not ALI. They observed BALF inflammation, but they did not observe pulmonary edema or the same pro-inflammatory cytokine expression profile as Samary et al. (2018).

Farris et al. [94] also explored the lung in MCAO mice, and they found alterations in the immune cell niche in the lungs of the ischemic animals, with a decrease of lymphocytes and an increase of alveolar macrophages and neutrophils. The production of multiple chemokines was reduced, including CCL3, CCL20, and CCL22 among others.

These three studies demonstrate the existence of pulmonary alterations after ischemic stroke, but there is some controversy between them. Thus, more research is needed to elucidate the extent of this lung damage and the mechanisms underlying it. In addition, whether the extension and nature of this lung damage is related with the occurrence of lung infections remains to be proved.

Conclusions

Despite the recent advances in acute stroke treatment with reperfusion therapies, SAI and particularly pneumonia represent some of the major complications after stroke, which have a high impact on patient outcomes and health care systems. Due to the failure of clinical trials on preventive antibiotics, attractive pathways for researchers and clinicians against this complication involve the prediction and early detection with biomarkers and preventive interventions with

immunomodulators. However, the rapidly changing clinical scenario of stroke patients creates new challenges for such research.

Despite the undoubted clinical benefits, the generalization of mechanical thrombectomy exposes hyperacute stroke patients to situations of high risk for aspiration, such as long transfers and prolonged interventions. Therefore, the need to move to very early interventions for both risk stratification and preventive measures points to the identification of earlier signals of the impaired immune response to identify both biomarkers and therapeutic targets. From a therapeutic point of view, researchers also have to consider the potential side-effects on the brain of enhancing systemic immunity. In this sense, the lungs arise as a potential therapeutic target to be explored in the next years, particularly the lung damage caused by brain ischemia, as well as the mechanisms and pathways that are involved.

Abbreviations

6-OHDA: 6-Hydroxydopamine; ALI: Acute lung injury; ANS: Autonomic nervous system; ArgI: Arginase-1; ARRB2: β -arrestin2; BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; BBB: Blood-brain barrier; CD: Cluster of differentiation; CNS: Central nervous system; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; CRP: C-reactive protein; DAMPs: Damage-associated molecular pattern; DHT: Dihydrotestosterone; FT3: Free triiodothyronine; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HDL: High-density lipoprotein; HLA-DR: Human leucocyte antigen-DR; HMGB1: High mobility group box 1; HPA: Hypothalamic-pituitary-adrenal; HRV: Heart rate variability; IFN- γ : Interferon- γ ; IL: Interleukin; iNKT: Hepatic invariant natural killer T; MCAO: Middle cerebral artery occlusion; MHR: Monocyte to HDL cholesterol ratio; miRNA-21: MicroRNA-21; MN: Metanephrine; MR-proADM: Mid-regional pro-adrenomedullin; NF- κ B: Nuclear factor kappa B; NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; NMN: Normetanephrene; PCT: Procalcitonin; PISCES: Pneumonia In Stroke Consensus; PNS: Parasympathetic nervous system; RAGE: Receptor of advanced glycation end-products; SAA: Serum amyloid A; SAI: Stroke-associated infection; SAP: Stroke-associated pneumonia; SII: Stroke-induced immunosuppression; SNS: Sympathetic nervous system; suPAR: Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor; TBI: Traumatic brain injury; Th: T-helper; THRCT: Thorax high resolution computed tomography; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; TRAF4: Tumor necrosis factor receptor-associated 4; UTI: Urinary tract infection; WBC: White blood cell; α 7nAChR: α 7 nicotinic acetylcholine receptor

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02177-0>.

Additional file 1: Table S1. Studied biomarkers for the prediction of SAI, SAP or UTI. This table summarizes the biomarkers presented in section 4 alphabetically ordered.

Acknowledgments

Not applicable.

Authors' contributions

AB, JM, and JF defined the research of interest and were involved in topic selection. JF carried out the literature review and wrote the first draft of the manuscript. AB, JM, and FMM reviewed the manuscript and made contributions for improvement. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This project received funding from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI17/02130], co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER), and from Fundació La Marató de TV3 [201706]. Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network INVICTUS+ [RD16/0019/0021].

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. ³Systemic Autoimmune Research Unit, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain. ⁴Stroke Research Program, Institute of Biomedicine of Seville, IBI/ Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville & Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Seville, Spain.

Received: 26 March 2021 Accepted: 19 May 2021

Published online: 06 June 2021

References

- Suda S, Aoki J, Shimoyama T, Suzuki K, Sakamoto Y, Katano T, et al. Stroke-associated infection independently predicts 3-month poor functional outcome and mortality. *J Neurol*. 2018;265(2):370–5. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8714-6>.
- Westendorp WF, Nederkooij PJ, Vermeij JD, Dijkgraaf MG, van de Beek D. Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*. 2011;11(1):110. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-110>.
- Bustamante A, Giral D, García-Berrocó T, Rubiera M, Álvarez-Sabín J, Molina C, et al. The impact of post-stroke complications on in-hospital mortality depends on stroke severity. *Eur Stroke J*. 2017;2(1):54–63. <https://doi.org/10.1177/2396987316681872>.
- Teh WH, Smith CJ, Barlas RS, Wood AD, Bettencourt-Silva JH, Clark AB, et al. Impact of stroke-associated pneumonia on mortality, length of hospitalization, and functional outcome. *Acta Neurol Scand*. 2018;138(4):293–300. <https://doi.org/10.1111/ane.12956>.
- Kishore AK, Vail A, Chamorro A, Garau J, Hopkins SJ, Di Napoli M, et al. How is pneumonia diagnosed in clinical stroke research? *Stroke*. 2015;46(5):1202–9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007843>.
- Smith CJ, Kishore AK, Vail A, Chamorro A, Garau J, Hopkins SJ, et al. Diagnosis of stroke-associated pneumonia: recommendations from the pneumonia in stroke consensus Group. *Stroke*. 2015;46(8):2335–40. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009617>.
- Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309–32. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2008.03.002>.
- Zapata-Arriaza E, Serrano-Gotarredona P, Navarro-Herrero S, Moniche F, Pardo-Galiana B, Pallisa E, et al. Chest computed tomography findings and validation of clinical criteria of stroke associated pneumonia. *J Stroke*. 2019;21(2):217–9. <https://doi.org/10.5853/jos.2018.03251>.
- Kishore AK, Devaraj A, Vail A, Ward K, Thomas PG, Sen D, et al. Use of pulmonary computed tomography for evaluating suspected stroke-associated pneumonia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2021;30(6):105757. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105757>.
- Kishore AK, Jeans AR, Garau J, Bustamante A, Kalra L, Langhorne P, et al. Antibiotic treatment for pneumonia complicating stroke: recommendations

- from the pneumonia in stroke consensus (PISCES) group. *Eur Stroke J*. 2019; 4(4):318–28. <https://doi.org/10.1177/2396987319851335>.
11. Ali AN, Howe J, Majid A, Redgrave J, Pownall S, Abdelhafiz AH. The economic cost of stroke-associated pneumonia in a UK setting. *Top Stroke Rehabil*. 2018;25(3):214–23. <https://doi.org/10.1080/10749357.2017.1398482>.
 12. Vermeij JD, Westendorp WF, Dippel DWJ, van de Beek D, Nederkoorn PJ. Antibiotic therapy for preventing infections in people with acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;1:CD008530.
 13. Dethlefsen L, Huse SM, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*. 2008;6(11):e280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>.
 14. Ery D, De Angelis ALH, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015;18(7):965–77. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>.
 15. Winek K, Engel O, Koduah P, Heimesaat MM, Fischer A, Bereswill S, et al. Depletion of cultivatable gut microbiota by broad-spectrum antibiotic pretreatment worsens outcome after murine stroke. *Stroke*. 2016;47(5):1354–63. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011800>.
 16. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nat Med*. 2015;22:516–23.
 17. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2012;17:796–808.
 18. Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell Type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003;198(5):725–36. <https://doi.org/10.1084/jem.20021098>.
 19. Yan FL, Zhang JH. Role of the sympathetic nervous system and spleen in experimental stroke-induced immunodepression. *Med Sci Monit*. 2014;20: 2489–96. <https://doi.org/10.12659/MSM.890844>.
 20. Moore KW, Malefyt RDW, Robert L, Garra AO. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Mol Cell Biol*. 2001;1:683–765.
 21. Jiang C, Kong W, Wang Y, Zhai W, Yang Q, Zuo F, et al. Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget*. 2017;8(2):3553–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12201>.
 22. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol*. 2006;176(11): 6523–31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6523>.
 23. Chiu NL, Kaiser B, Nguyen YV, Welbourne S, Lall C, Cramer SC. The volume of the spleen and its correlates after acute stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016; 25(12):2958–61. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.012>.
 24. Liu Q, Jin WN, Liu Y, Shi K, Sun H, Zhang F, et al. Brain ischemia suppresses immunity in the periphery and brain via different neurogenic innervations. *Immunity*. 2017;46(3):474–87. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.015>.
 25. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev United States*. 2000;52:595–638.
 26. Wang H, Deng QW, Peng AN, Xing FL, Zuo L, Li S, et al. B-Arrestin2 functions as a key regulator in the sympathetic-triggered immunodepression after stroke. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/s12950-017-0178-z>.
 27. McCulloch L, Smith CJ, McColl BW. Adrenergic-mediated loss of splenic marginal zone B cells contributes to infection susceptibility after stroke. *Nat Commun*. 2017;8:1–15.
 28. Emsley HCA, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1–2):93–101. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00134-6).
 29. Franceschini R, Tenconi GL, Zoppoli F, Barreca T. Endocrine abnormalities and outcome of ischaemic stroke. *Biomed Pharmacother*. 2001;55(8):458–65. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)00086-5](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)00086-5).
 30. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SJ, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 2011;334(6052):98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>.
 31. Engel O, Akyüz L, Da Costa Goncalves AC, Winek K, Dames C, Thielke M, et al. Cholinergic pathway suppresses pulmonary innate immunity facilitating pneumonia after stroke. *Stroke*. 2015;46(11):3232–40. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.008989>.
 32. Lafargue M, Xu L, Carlès M, Serve E, Anjum N, Iles KE, et al. Stroke-induced activation of the $\alpha 7$ nicotinic receptor increases *Pseudomonas aeruginosa* lung injury. *FASEB J*. 2012;26(7):2919–29. <https://doi.org/10.1096/fj.11-1973.84>.
 33. Wong CHY, Jenne CN, Lee W-Y, Léger C, Kubes P. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science*. 2011; 334(6052):101–5. <https://doi.org/10.1126/science.1210301>.
 34. Sippel TR, Shimizu T, Strnad F, Traystman RJ, Herson PS, Waziri A. Arginase I release from activated neutrophils induces peripheral immunosuppression in a murine model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(10):1657–63. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.103>.
 35. Petrone AB, O'Connell GC, Regier MD, Chantler PD, Simpkins JW, Barr TL. The role of arginase 1 in post-stroke immunosuppression and ischemic stroke severity. *Transl Stroke Res*. 2016;7(2):103–10. <https://doi.org/10.1007/s12975-015-0431-9>.
 36. Ashour W, Al-Anwar AD, Kamel AE, Aidaros MA. Predictors of early infection in cerebral ischemic stroke. *J Med Life*. 2016;9(2):163–9.
 37. Nam KW, Kim TJ, Lee JS, Kwon HM, Lee YS, Ko SB, et al. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts stroke-associated pneumonia. *Stroke*. 2018;49(8): 1886–92. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021228>.
 38. Liesz A, Dalpke A, Mracsko E, Antoine DJ, Roth S, Zhou W, et al. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J Neurosci*. 2015;35(2):583–98. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2439-14.2015>.
 39. O'Connell GC, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, Chantler PD, et al. Monocyte-lymphocyte cross-communication via soluble CD163 directly links innate immune system activation and adaptive immune system suppression following ischemic stroke. *Sci Rep*. 2017;7:1–14.
 40. Ritzel RM, Al Mamun A, Crapser J, Verma R, Patel AR, Knight BE, et al. CD200-CD200R1 inhibitory signaling prevents spontaneous bacterial infection and promotes resolution of neuroinflammation and recovery after stroke. *J Neuroinflammation*. 2019;16:1–16.
 41. Roth S, Cao J, Singh V, Tiedt S, Hundeshagen G, Li T, et al. Post-injury immunosuppression and secondary infections are caused by an AIM2 inflammasome-driven signaling cascade. *Immunity*. 2021;54:648–659.e8.
 42. Ruhnau J, Schulze K, Gaida B, Langner S, Kessler C, Broker B, et al. Stroke alters respiratory burst in neutrophils and monocytes. *Stroke*. 2014;45(3): 794–800. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.003342>.
 43. van Gemmeren T, Schuppner R, Grosse GM, Fering J, Gabriel MM, Huber R, et al. Early post-stroke infections are associated with an impaired function of neutrophil granulocytes. *J Clin Med*. 2020;9(3):872. <https://doi.org/10.3390/jcm9030872>.
 44. Li S, Lu G, Wang D, He JL, Zuo L, Wang H, et al. MicroRNA-4443 regulates monocyte activation by targeting tumor necrosis factor receptor associated factor 4 in stroke-induced immunosuppression. *Eur J Neurol*. 2020;27(8): 1625–37. <https://doi.org/10.1111/ene.14282>.
 45. Zapata-Arriaza E, Moniche F, Blanca P-G, Bustamante A, Escudero-Martínez I, Uclés O, et al. External validation of the ISAN, A2DS2, and AIS-APS scores for predicting stroke-associated pneumonia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018; 27(3):673–6. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.059>.
 46. Zang B, Subramanian S, Dziennis S, Jia J, Uchida M, Akiyoshi K, et al. Estradiol and G1 reduce infarct size and improve immunosuppression after experimental stroke. *J Immunol*. 2010;184(8):4087–94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902339>.
 47. Dziennis S, Akiyoshi K, Subramanian S, Offner H, Hurn PD. Role of dihydrotestosterone in post-stroke peripheral immunosuppression after cerebral ischemia. *Brain Behav Immun*. 2011;25(4):685–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.009>.
 48. Gill D, Sivakumaran P, Aravind A, Tank A, Dosh R, Veltkamp R. Temporal trends in the levels of peripherally circulating leukocyte subtypes in the hours after ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(1):198–202. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.08.023>.
 49. Fluri F, Morgenthaler NG, Mueller B, Christ-Crain M, Katan M. Copeptin, Procalcitonin and routine inflammatory markers-predictors of infection after stroke. *PLoS One*. 2012;7:e48309.
 50. De Raedt S, De Vos A, Van Binst AM, De Waele M, Coomans D, Buyl R, et al. High natural killer cell number might identify stroke patients at risk of developing infections. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(2):e71. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000071>.

51. Sun Y, Lu J, Zheng D, Qian J, Zhang H, Xing D, et al. Predictive value of monocyte to HDL cholesterol ratio for stroke-associated pneumonia in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Belg*. 2020;7.
52. Zonneveld TP, Nederkoorn PJ, Westendorp WF, Brouwer MC, van De Beek D, Kruyt ND. Hyperglycemia predicts poststroke infections in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2017;88(15):1415–21. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003811>.
53. Rodríguez-Sanz A, Fuentes B, Martínez-Sánchez P, Prefasi D, Martínez-Martínez M, Correas E, et al. High-density lipoprotein: a novel marker for risk of in-hospital infection in acute ischemic stroke patients? *Cerebrovasc Dis*. 2013;35(3):291–7. <https://doi.org/10.1159/000347077>.
54. Dziedzic T, Pera J, Klimkowicz A, Turaj W, Slowik A, Rog TM, et al. Serum albumin level and nosocomial pneumonia in stroke patients. *Eur J Neurol*. 2006;13(3):299–301. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01210.x>.
55. Ye S, Lin SP, Wu K, Fan Y, Xu M. Serum prealbumin is a predictive biomarker for stroke-associated infection after an ischemic stroke. *Int J Neurosci*. 2017;127(7):601–5. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1218874>.
56. Huang GQ, Cheng HR, Wu YM, Cheng QQ, Wang YM, Fu JL, et al. Reduced vitamin D levels are associated with stroke-associated pneumonia in patients with acute ischemic stroke. *Clin Interv Aging*. 2019;14:2305–14. <https://doi.org/10.2147/CIA.S230255>.
57. Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, Sánchez-Poblet J, García-Berrococo T, Giral D, et al. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis. *J Neurochem*. 2017;141(2):305–14. <https://doi.org/10.1111/jnc.13973>.
58. Azurmendi L, Lapierre-Fetaud V, Schneider J, Montaner J, Katan M, Sanchez JC. Proteomic discovery and verification of serum amyloid A as a predictor marker of patients at risk of post-stroke infection: a pilot study. *Clin Proteomics*. 2017;14–27.
59. Schweizer J, Bustamante A, Lapierre-Fétaud V, Faura J, Scherrer N, Azurmendi Gil L, et al. SAA (serum amyloid A): a novel predictor of stroke-associated infections. *Stroke*. 2020;51(12):3523–30. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030064>.
60. Zapata-Arriaza E, Mancha F, Bustamante A, Moniche F, Pardo-Galiana B, Serrano-Gotarredona P, et al. Biomarkers predictive value for early diagnosis of stroke-associated pneumonia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(9):1882–7. <https://doi.org/10.1002/acn3.50849>.
61. Bustamante A, García-Berrococo T, Penalba A, Giral D, Simats A, Muchada M, et al. Sepsis biomarkers reprofiling to predict stroke-associated infections. *J Neuroimmunol*. 2017;312:19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.08.012>.
62. Hoffmann S, Harms H, Ulm L, Nabavi DG, Mackert BM, Schmehl I, et al. Stroke-induced immunodepression and dysphagia independently predict stroke-associated pneumonia – The PREDICT study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(12):3671–82. <https://doi.org/10.1177/0271678X16671964>.
63. Ulm L, Hoffmann S, Nabavi D, Hermans M, Mackert BM, Hamilton F, et al. The randomized controlled STRAWINSKI trial: Procalcitonin-guided antibiotic therapy after stroke. *Front Neurol*. 2017;8:1–10.
64. Hotter B, Hoffmann S, Ulm L, Montaner J, Bustamante A, Meisel C, et al. Inflammatory and stress markers predicting pneumonia, outcome, and etiology in patients with stroke: Biomarkers for predicting pneumonia, functional outcome, and death after stroke. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(3):e692. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000692>.
65. Hug A, Mürle B, Dalpke A, Zorn M, Liesz A, Veltkamp R. Usefulness of serum procalcitonin levels for the early diagnosis of stroke-associated respiratory tract infections. *Neurocrit Care*. 2011;14(3):416–22. <https://doi.org/10.1007/s12028-009-9325-6>.
66. Worthmann H, Trzc AB, Dirks M, Schuppner R, Brand K, Klawonn F, et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J Neuroinflammation*. 2015;12:1–9.
67. Kwan J, Horsfield G, Bryant T, Gawne-Cain M, Durward G, Byrne CD, et al. IL-6 is a predictive biomarker for stroke associated infection and future mortality in the elderly after an ischemic stroke. *Exp Gerontol*. 2013;48(9):960–5. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.07.003>.
68. Bustamante A, Sobrino T, Giral D, García-Berrococo T, Llombart V, Ugarriza I, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2014;274(1–2):215–24. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.015>.
69. Chamorro Á, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera Á, Torres F, et al. Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(11):1279–81. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.100800>.
70. Salat D, Penalba A, García-Berrococo T, Campos-Martorell M, Flores A, Pagola J, et al. Immunological biomarkers improve the accuracy of clinical risk models of infection in the acute phase of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35(3):220–7. <https://doi.org/10.1159/000346591>.
71. Lin SP, Ye S, Chen XH, Jiang HL, Mao HF, Chen MT, et al. Increased expression of microRNA-21 in peripheral blood mediates the down-regulation of IFN- γ and increases the prevalence of stroke-associated infection. *J Neurol Sci*. 2016;366:235–9. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.03.034>.
72. Tanzi P, Cain K, Kalil A, Zierath D, Savos A, Gee JM, et al. Post-stroke infection: a role for IL-1ra? *Neurocrit Care*. 2011;14(2):244–52. <https://doi.org/10.1007/s12028-010-9490-7>.
73. Zhang DP, Yan FL, Xu HQ, Zhu YX, Yin Y, Lu HQ. A decrease of human leucocyte antigen-DR expression on monocytes in peripheral blood predicts stroke-associated infection in critically-ill patients with acute stroke. *Eur J Neurol*. 2009;16(4):498–505. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02512.x>.
74. Günther A, Salzmänn I, Nowack S, Schwab M, Surber R, Hoyer H, et al. Heart rate variability - a potential early marker of sub-acute post-stroke infections. *Acta Neurol Scand*. 2012;126(3):189–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2011.01626.x>.
75. Suda S, Aoki J, Shimoyama T, Suzuki K, Sakamoto Y, Katano T, et al. Low free triiodothyronine at admission predicts poststroke infection. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(2):397–403. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.012>.
76. Badve MS, Zhou Z, Anderson CS, Hackett ML. Effectiveness and safety of antibiotics for preventing pneumonia and improving outcome after acute stroke: systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(11):3137–47. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.07.001>.
77. Stanley D, Mason LJ, MacKin KE, Srihanta YN, Lyras D, Prakash MD, et al. Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. *Nat Med*. 2016;22(11):1277–84. <https://doi.org/10.1038/nm.4194>.
78. Liu DD, Chu SF, Chen C, Yang PF, Chen NH, He X. Research progress in stroke-induced immunodepression syndrome (SIDS) and stroke-associated pneumonia (SAP). *Neurochem Int*. 2018;114:42–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.01.002>.
79. Deng QW, Yang H, Yan FL, Wang H, Xing FL, Zuo L, et al. Blocking sympathetic nervous system reverses partially stroke-induced immunosuppression but does not aggravate functional outcome after experimental stroke in rats. *Neurochem Res*. 2016;41(8):1877–86. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1899-8>.
80. Sykora M, Siarnik P, Diedler J. β -Blockers, pneumonia, and outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46(5):1269–74. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.008260>.
81. Maier IL, Karch A, Mikolajczyk R, Bähr M, Liman J. Effect of beta-blocker therapy on the risk of infections and death after acute stroke—a historical cohort study. *PLoS One*. 2015;10:1–10.
82. Maier IL, Becker JC, Leyhe JR, Schnieder M, Behme D, Psychogios MN, et al. Influence of beta-blocker therapy on the risk of infections and death in patients at high risk for stroke induced immunodepression. *PLoS One*. 2018;13:1–11.
83. Jin R, Liu S, Wang M, Zhong W, Li G. Inhibition of CD147 attenuates stroke-associated pneumonia through modulating lung immune response in mice. *Front Neurol*. 2019;10:1–15.
84. Guan YT, Mao LL, Jia J, Dong CS, Zhou XM, Zheng SL, et al. Postischemic administration of a potent PTEN inhibitor reduces spontaneous lung infection following experimental stroke. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(12):990–3. <https://doi.org/10.1111/cns.12188>.
85. Dames C, Winek K, Beckers Y, Engel O, Meisel A, Meisel C. Immunomodulatory treatment with systemic GM-CSF augments pulmonary immune responses and improves neurological outcome after experimental stroke. *J Neuroimmunol*. 2018;321:144–9. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.03.005>.
86. Goyagi T, Horiguchi T, Nishikawa T, Tobe Y. Post-treatment with selective β 1 adrenoceptor antagonists provides neuroprotection against transient focal ischemia in rats. *Brain Res Netherlands*. 2010;1343:213–7. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.079>.

87. Bai W, Li W, Ning YL, Li P, Zhao Y, Yang N, et al. Blood glutamate levels are closely related to acute lung injury and prognosis after stroke. *Front Neurol*. 2018;8:1–11.
88. Mrozek S, Constantin J-M, Geeraerts T. Brain-lung crosstalk: implications for neurocritical care patients. *World J Crit Care Med*. 2015;4(3):163–78. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v4.i3.163>.
89. Hu PJ, Pittet JF, Kerby JD, Bosarge PL, Wagener BM. Acute brain trauma, lung injury, and pneumonia: more than just altered mental status and decreased airway protection. *Am J Phys Lung Cell Mol Phys*. 2017;313(1):L1–15. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00485.2016>.
90. Wen SW, Wong CHY. An unexplored brain-gut microbiota axis in stroke. *Gut Microbes*. 2017;8(6):601–6. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1344809>.
91. Mascia L. Acute lung injury in patients with severe brain injury: a double hit model. *Neurocrit Care*. 2009;11(3):417–26. <https://doi.org/10.1007/s12028-009-9242-8>.
92. Samary CS, Ramos AB, Maia LA, Rocha NN, Santos CL, Magalhães RF, et al. Focal ischemic stroke leads to lung injury and reduces alveolar macrophage phagocytic capability in rats. *Crit Care Critical Care*. 2018;22:1–11.
93. Austin V, Ku JM, Miller AA, Vlahos R. Ischaemic stroke in mice induces lung inflammation but not acute lung injury. *Sci Rep*. 2019;9:1–10.
94. Farris BY, Monaghan KL, Zheng W, Amend CD, Hu H, Ammer AG, et al. Ischemic stroke alters immune cell niche and chemokine profile in mice independent of spontaneous bacterial infection. *Immunity, Inflamm Dis*. 2019;7(4):326–41. <https://doi.org/10.1002/iid3.277>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



CARRERA CIENTÍFICA DE LA DOCTORANDA

Formació acadèmica universitària

- **Doctorat en Neurociències** (en curs). Universitat Autònoma de Barcelona. Laboratori d'Investigació Neurovascular (LIN), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR).
- **Màster oficial en Bioinformàtica i Bioestadística** (2019-2021). Universitat Oberta de Catalunya. Universitat de Barcelona.
- **Màster oficial en Recerca Biomèdica Translacional** (2016-2017). Universitat Autònoma de Barcelona. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR).
- **Grau en Biologia** (2012-2016). Universitat Autònoma de Barcelona.

Producció científica

- Jiménez-Balado J., Pizarro J., Riba-Llena I., Penalba A., **Faura J.**, Palà E., Montaner J., Hernández-Guillamon M., Delgado P. (2021). *New candidate blood biomarkers potentially associated with white matter hyperintensities progression*. Scientific Reports. 11 (1), 14324.
- **Faura J.**, Bustamante A., Miró-Mur F., Montaner J. *Stroke-Induced Immunosuppression: Implications for the Prevention and Prediction of Post-Stroke Infections*. (2021). Journal of Neuroinflammation. 2021; 18 (1), 127.
- Marazuela P., Bonaterra-Pastra A., **Faura J.**, Penalba A., Pizarro J., Pancorbo O., Rodríguez-Luna, D., Vert C., Rovira A, Pujadas F, Freijo M, Tur S, Martínez-Zabaleta M, Arenillas J, Pérez-Sánchez S, Montaner J, Delgado P, Hernández-Guillamón M. (2021). *Circulating AQP4 levels in patients with cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage*. (2021). Journal of Clinical Medicine, 10 (5), 989.
- **Faura J.**, Bustamante A., Reverté S., García-Berrocoso T., Millán M., Castellanos M., Lara-Rodríguez B., Zaragoza J., Ventura O., Hernández-Pérez M., van Eedenburg C., Cardona P., López-Cancio E., Cánovas D., Serena J., Rubiera M., Dávalos A., Montaner J. (2021). *Blood biomarkers panels for the early prediction of stroke-associated complications*. Journal of the American Heart Association (JAHA), 10 (5), e018946.
- Schweizer J., Bustamante A., Lapierre-Fétaud V., **Faura J.**, Scherrer N., Azurmendi Gil L., Fluri F., Schütz V., Luft A., Boned S., Sanchez JC., Montaner J., Katan M. (2020). *SAA (Serum Amyloid A) - A Novel Predictor of Stroke-Associated Infections*. Stroke, 51 (12), 3523-3530.

- **Faura J.**, Bustamante A., Penalba, A., Giralte D., Simats A., Martínez-Sáez E., Alcolea D., Fortea J., Lleó A., Teunissen CE., van der Flier WM., Ibáñez L., Harari O., Cruchaga C., Hernández-Guillamón M., Delgado P., Montaner J. (2020). *CCL23: A Chemokine Associated with Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 73 (4), 1585-1595.
- Zapata-Arriaza E., Mancha F., Bustamante A., Moniche F., Pardo-Galiana B., Serrano-Gotarredona P., Navarro-Herrero S., Pallisa E., **Faura J.**, Vega-Salvatierra Á., Penalba A., Escudero-Martínez I., Ramos-Herrero VD., Azurmendi L., Charles Sanchez J., Montaner J. (2019). *Biomarkers predictive value for early diagnosis of Stroke-Associated Pneumonia*. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6 (9), 1882-1887.
- Llombart V., Trejo, S., Bronsoms S., Morancho A., Feifei M., **Faura J.**, García-Berrocó T., Simats A., Rosell A., Canals F., Hernández-Guillamón M. and Montaner, J. (2017). *Profiling and identification of new proteins involved in brain ischemia using MALDI-imaging-mass-spectrometry*. *Journal of Proteomics*, 152, 243-253.

Participació en projectes d'investigació

- *MULTI-BIO-TARGETS: una nueva estrategia para el manejo del ictus combinando biomarcadores pronósticos y neuroprotectores*. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). PI18/00804 (01/01/2019 – 31/12/2021). IP: Joan Montaner.
- *Descubrimiento y validación de biomarcadores de neumonía asociada al ictus*. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). PI17/02130 (01/01/2018 – 31/12/2021). IP: Alejandro Bustamante.
- *Discovery and clinical usefulness of blood biomarkers in stroke-associated pneumonia. The PROteomics and Transcriptomics in IEUkocyte Subpopulations (PROTEUS) study*. Fundació La Marató de TV3. 201706 (01/01/2018 – 31/12/2021). IP: Olga Maisterra.

Formació científica: cursos i congressos

- **European Stroke Organization – World Stroke Organization Virtual Conference 2021**. Conferència virtual, 1-3 de setembre de 2021. Assistència i presentació d'una comunicació en format poster. Títol del poster: *“Evaluation and characterization of the lung damage following cerebral ischemia in mice”*.

- **Brain Biomarker Day 2021.** Conferència virtual, 17 de març de 2021. Assistència i presentació d'un *elevator pitch*. Títol de la presentació: *"Blood biomarker panels for the early prediction of stroke-associated complications"*.
- **IV Reunión Anual de la Red temática de Investigación en Enfermedades Vasculares Cerebrales RETICS-INVICTUS+.** Conferència virtual, 21 de gener de 2021. Assistència i presentació d'una comunicació en format oral. Títol de la presentació: *"Evaluación y caracterización del fluido de lavado broncoalveolar en animales de isquemia cerebral"*.
- **European Stroke Organization – World Stroke Organization Virtual Conference 2020.** Conferència virtual, 7-9 de novembre de 2020. Assistència i presentació d'una comunicació en format poster. Títol del poster: *"Blood biomarkers panels for the early prediction of stroke-associated complications"*.
- **Curs d'Experimentació Animal.** Funcions A, B i C. Animalaria, Maig 2020.
- **III Reunión Anual de la Red temática de Investigación en Enfermedades Vasculares Cerebrales RETICS-INVICTUS+.** Santiago de Compostela, Espanya, 7-8 de novembre de 2019. Assistència i presentació d'una comunicació en format oral. Títol de la presentació: *"Uso de técnicas –ómicas para el estudio de subpoblaciones leucocitarias en pacientes con neumonía asociada al ictus"*.
- **VII Jornades científiques INC.** Sant Feliu de Guíxols, 1-3 d'octubre de 2019. Assistència i presentació d'una comunicació en format oral. Títol de la presentació: *"Proteomic profiling of leukocyte subpopulations in stroke-associated pneumonia patients"*.
- **LXX Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología.** Sevilla, 20-24 de novembre de 2018. Assistència i participació d'una comunicació en format oral. Títol de la presentació: *"Análisis transcriptómico de subpoblaciones leucocitarias en pacientes con neumonía asociada al ictus"*.
- **Curs de Bioinformàtica per a la Recerca Biomèdica.** Unitat d'Estadística i Bioinformàtica (UEB, VHIR), Novembre 2018.

