



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS  
ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES  
SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

**Alejandro Bustamante Rangel**

DIRECTORES

Joan Montaner Villalonga

Carlos A. Molina Cateriano

TUTOR

David García Dorado

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2016





## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>Pág. 4</b>
1.1. El ictus isquémico	Pág. 5
1.2. Condicionantes pronósticos del ictus	Pág. 6
1.2.1. Factores no modificables	Pág. 9
1.2.2. Complicaciones de la fase hiperaguda	Pág. 10
1.2.3. Complicaciones de la fase subaguda	Pág. 13
1.2.4. Complicaciones de la fase crónica	Pág. 17
1.3. Predicción del pronóstico global del ictus	Pág. 19
1.4. Biomarcadores sanguíneos en el ictus.	Pág. 19
1.5. Predicción del pronóstico del ictus mediante biomarcadores sanguíneos	Pág. 21
1.6. Predicción de las complicaciones del ictus mediante biomarcadores sanguíneos	Pág. 24
<b>2. Objetivos</b>	<b>Pág. 27</b>
<b>3. Métodos y resultados. Copia de las publicaciones</b>	<b>Pág. 29</b>
3.1.1. Neuroendocrine hormones as prognostic biomarkers in the setting of acute stroke: overcoming the major hurdles. <i>Bustamante A, et al. Expert Rev Neurother. 2014; 14: 1391-1403</i>	Pág. 30
3.2. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis. <i>Bustamante A, et al. J Neuroimmunol. 2014; 15; 274: 215-224</i>	Pág. 44
3.3. Factor seven activating protease (FSAP) predicts response to intravenous thrombolysis in acute ischaemic stroke. <i>Bustamante A, et al. Int J Stroke 2015 [manuscrito en prensa]</i>	Pág. 56
<b>4. Síntesis de los resultados y discusión</b>	<b>Pág. 63</b>
4.1. Utilidad de la predicción del pronóstico en el ictus	Pág. 64
4.2. Evaluación de las complicaciones del ictus en nuestro medio. Implicaciones para el uso de biomarcadores	Pág. 65
4.3. ¿Son útiles los biomarcadores sanguíneos para el manejo del edema cerebral y el infarto maligno de la arteria cerebral media?	Pág. 66
4.4. Manejo de las terapias de reperfusión mediante biomarcadores sanguíneos	Pág. 66
4.5. Papel de los biomarcadores sanguíneos en el manejo de las infecciones asociadas al ictus	Pág. 68

4.6.	Papel de los biomarcadores sanguíneos en el manejo de las complicaciones cardíacas del ictus	Pág. 71
4.7.	Próximos pasos:	Pág. 72
4.7.1.	Descubrimiento de nuevos biomarcadores sanguíneos. Papel de las “ómicas”	Pág. 72
4.7.2.	Grandes estudios observacionales multicéntricos	Pág. 73
4.7.3.	Estudios semi-intervencionales y ensayos clínicos basados en biomarcadores	Pág. 73
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b>	Pág. 75
<b>6.</b>	<b>Referencias</b>	Pág. 77
<b>7.</b>	<b>Abreviaciones</b>	Pág. 91

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL ICTUS ISQUÉMICO

La Organización Mundial de la Salud define el ictus como el rápido desarrollo de síntomas clínicos indicativos de un trastorno focal o generalizado de la función cerebral, cuyos síntomas persisten 24 o más horas o conducen a la muerte sin que exista otra causa aparente que la vascular [Hatano S, 1076]. El ictus se puede clasificar como isquémico o hemorrágico, según se produzca una disminución del flujo sanguíneo que llega a alguna región del cerebro, produciéndose necrosis tisular por daño neuronal irreversible (ictus isquémico o infarto cerebral, representando el 80% de los casos), o una extravasación de sangre dentro de la cavidad craneal secundaria a la rotura de un vaso sanguíneo (ictus hemorrágico o hemorragia cerebral, 20% restante) [Arboix A, 2006]. En el presente trabajo nos referiremos de forma exclusiva al ictus isquémico.

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en todo el mundo. Las últimas estadísticas europeas cifraban la incidencia ajustada por la edad para el ictus en 114,7/100.000 hombres y 74,9/100.000 mujeres [Heuschmann PU, 2009], suponiendo la segunda causa de mortalidad en Europa, con 1,1 millones de muerte cada año, cifras que representan el 15% del total de muertes en la mujer y el 10% en el hombre [Nichols M, 2012]. En el año 2013, la enfermedad cerebrovascular constituía la segunda causa, primera en la mujer, de mortalidad específica en España, por detrás del infarto de miocardio [Instituto Nacional de Estadística, 2015]. La incidencia global de ictus en España no se conoce con precisión, y se estima que puede oscilar entre 120-350 casos por 100.000 habitantes/año, tasas que se multiplican por 10 en la población mayor de 75 años de edad [Medrano MJ, 2006]. Sin embargo, en los últimos años hemos podido comprobar que los avances en la prevención y el manejo del ictus están dando sus frutos, de forma que, en estadísticas más recientes, el ictus ha descendido hasta situarse como la quinta causa de muerte en Estados Unidos, [Mozafarian D, 2016].

Pero más allá de su letalidad, el ictus supone una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo. Se estima que aproximadamente la mitad de los pacientes que sobreviven a un ictus experimentan algún grado de discapacidad física o cognitiva, y en un 20% de los casos esta es tan importante como para requerir la institucionalización del paciente. Estas cifras sitúan al ictus como la tercera causa de discapacidad a nivel mundial, suponiendo un 1,6% y un 2,5% del total de la discapacidad ajustada por años de vida para el ictus isquémico y hemorrágico, respectivamente [Murray JL, 2012].



# INTRODUCCIÓN

## 1.2. CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS

El pronóstico del ictus puede entenderse desde puntos de vista diferentes y a la vez complementarios, como serían el pronóstico neurológico, funcional y vital. Desde el punto de vista vital, como ya hemos mencionado, el ictus supone actualmente la quinta causa de mortalidad y, solamente a nivel hospitalario, entre un 11 y un 15% de los pacientes con ictus isquémico fallecen, cifras que se incrementan con la edad y afectan por igual a ambos sexos [Johnston SC, 2009].

El pronóstico neurológico es de especial interés en la fase aguda y subaguda del ictus, ya que proporciona una medida objetiva de la situación del paciente, permitiendo monitorizar su evolución clínica y detectar un deterioro del estado neurológico. La escala de ictus de la National Institutes of Health (NIHSS) es la más utilizada en las unidades de ictus para este propósito [Brott T, 1989; Montaner J, 2006]. Usualmente es evaluada al menos cada 24 horas durante los primeros días tras el ictus, así como antes y después del uso de terapias de reperusión o ante la sospecha de deterioro neurológico, considerándose este como un aumento de dicha escala igual o superior a cuatro puntos, mientras que una reducción en cuatro o más puntos se considera mejoría [Brott TG, 1992]. El deterioro neurológico ocurre en un 13,8% de los pacientes tratados mediante trombolisis intravenosa en las primeras 24 horas y supone un predictor importante de mal pronóstico funcional a largo plazo [Seners P, 2015], pudiendo además alertar sobre el desarrollo de complicaciones como edema cerebral o transformación hemorrágica [Thanvi B, 2008; Siegler JE, 2011].

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 1. Adaptación al castellano de la escala de ictus del National Institute of Health (NIHSS). Adaptado de Montaner J, et al. Neurología 2006**

<b>NIVEL DE CONCIENCIA</b>	Alerta	0	
	Estuporoso	1	
	Coma	2	
<b>PREGUNTAS LOC</b>	Responde ambas correctamente	0	
	Responde una correctamente	1	
	Incorrecto	2	
<b>ÓRDENES LOC</b>	Realiza ambas correctamente	0	
	Realiza una correctamente	1	
	Incorrecto	2	
<b>MIRADA</b>	Normal	0	
	Parálisis parcial de la mirada	1	
	Desviación oculocefálica	2	
<b>CAMPOS VISUALES</b>	Sin déficit campimétrico	0	
	Hemianopsia parcial	1	
	Hemianopsia completa	2	
	Hemianopsia bilateral	3	
<b>PARÁLISIS FACIAL</b>	Movimientos normales y simétricos	0	
	Paresia ligera	1	
	Parálisis parcial	2	
	Parálisis completa	3	
<b>BRAZO IZQUIERDO</b>	No claudica (BM 5)	0	
	Claudica (BM 4)	1	
	Algún esfuerzo contra gravedad (BM 3)	2	
	Sin esfuerzo contra gravedad (BM 1-2)	3	
	Ningún movimiento (BM 0)	4	
<b>BRAZO DERECHO</b>	No claudica (BM 5)	0	
	Claudica (BM 4)	1	
	Algún esfuerzo contra gravedad (BM 3)	2	
	Sin esfuerzo contra gravedad (BM 1-2)	3	
	Ningún movimiento (BM 0)	4	
<b>PIERNA IZQUIERDA</b>	No claudica (BM 5)	0	
	Claudica (BM 4)	1	
	Algún esfuerzo contra gravedad (BM 3)	2	
	Sin esfuerzo contra gravedad (BM 1-2)	3	
	Ningún movimiento (BM 0)	4	
<b>PIERNA DERECHA</b>	No claudica (BM 5)	0	
	Claudica (BM 4)	1	
	Algún esfuerzo contra gravedad (BM 3)	2	
	Sin esfuerzo contra gravedad (BM 1-2)	3	
	Ningún movimiento (BM 0)	4	
<b>ATAXIA DE MIEMBROS</b>	Ausente	0	
	Presente en una extremidad	1	
	Presente en dos extremidades	2	
<b>SENSIBILIDAD</b>	Normal	0	
	Hipoestesia ligera a moderada	1	
	Hipoestesia severa o anestesia	2	
<b>LENGUAJE</b>	Normal, sin afasia	0	
	Afasia ligera a moderada	1	
	Afasia severa. Broca, Wernicke	2	
	Afasia global o mutismo	3	
<b>DISARTRIA</b>	Articulación normal	0	
	Ligera a moderada	1	
	Severa o anartria	2	
<b>EXTINCIÓN</b>	Sin anormalidad	0	
	Parcial (una modalidad afecta)	1	
	Completa (más de una modalidad)	2	
<b>TOTAL</b>			

El estado funcional del paciente con ictus a largo plazo es quizás el modo más interesante de establecer el pronóstico del mismo, no en vano es utilizado como parámetro principal de eficacia en la mayor parte de los ensayos clínicos en la fase aguda del ictus [Saver JL, 2011]. La situación funcional suele medirse mediante la escala de Rankin modificada, cuyas puntuaciones oscilan de 0 a 6 puntos, y valora las capacidades del paciente para la realización de las actividades básicas de la vida diaria [Van Swieten JC, 1988]. La dicotomización de dicha escala en  $>2$  o  $\leq 2$  puntos suele utilizarse para reportar buen o mal pronóstico funcional, ya que este punto de corte marca la diferencia entre la autonomía funcional y la dependencia.

## INTRODUCCIÓN

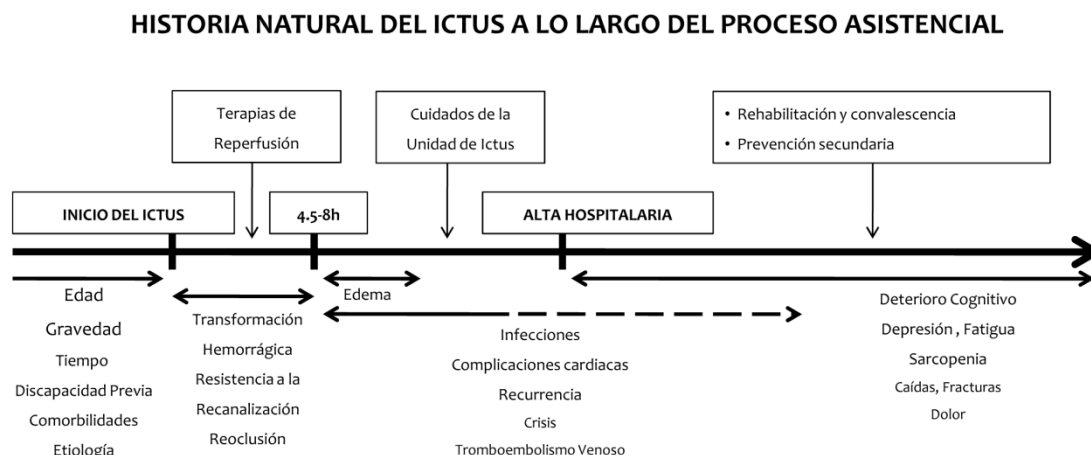
*Tabla 2. Escala de Rankin modificada. Traducido de Van Swieten JC, et al. Stroke 1988*

GRADO	Descripción	
<b>0</b>	<b>Ningún síntoma</b>	
<b>1</b>	<b>Sin incapacidad importante</b>	Capaz de realizar sus actividades y obligaciones habituales
<b>2.</b>	<b>Incapacidad leve</b>	Incapaz de realizar algunas de sus actividades previas, pero capaz de velar por sus intereses y asuntos sin ayuda
<b>3.</b>	<b>Incapacidad moderada</b>	Síntomas que restringen significativamente su estilo de vida o impiden su subsistencia totalmente autónoma (p. ej. necesitando alguna ayuda)
<b>4.</b>	<b>Incapacidad moderadamente severa</b>	Síntomas que impiden claramente su subsistencia independiente aunque sin necesidad de atención continua (p. ej. incapaz para atender sus necesidades personales sin asistencia)
<b>5.</b>	<b>Incapacidad severa</b>	Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche
<b>6.</b>	<b>Muerte</b>	

Los factores que determinan el pronóstico del ictus son numerosos y difíciles de sintetizar, dada la variabilidad de la enfermedad entre individuos y lo imprevisible de la misma. Desde el punto de vista clínico, suele hacerse división entre aquellos factores no modificables, ya presentes generalmente cuando el paciente es atendido por primera vez, y sobre los que poco o nada podemos actuar. Los principales ejemplos aquí serían la edad del paciente y la gravedad del ictus, usualmente medida mediante la escala de ictus de la NIHSS [Weimar C, 2004]. Por otra parte, otros factores que pueden ocurrir más tarde en la evolución del ictus también tendrán un impacto y una importancia sobre el pronóstico del mismo. Son las denominadas complicaciones del ictus, y su importancia radica en que su aparición podría ser predicha o detectada precozmente por el médico, lo cual nos proporciona la oportunidad de instaurar una profilaxis o tratamiento precoz destinado a evitar el desarrollo de la complicación o minimizar sus consecuencias. Diversos estudios han estimado que el pronóstico final del ictus viene determinado aproximadamente en 2/3 por los factores no modificables, mientras que el tercio restante lo determinan las complicaciones del ictus [Appelros P, 2003]. En las siguientes páginas enumeraremos estos factores de acuerdo al momento de la historia natural de la enfermedad en la que hacen su aparición, como se muestra en la figura.

# INTRODUCCIÓN

**Figura 1. Condicionantes pronósticos del ictus a través de la historia natural del mismo. Modificada de Bustamante A, et al. Eur J Intern Med 2015.**



## COMPLICACIONES DEL ICTUS EN LOS DISTINTOS MOMENTOS DE SU HISTORIA NATURAL

La figura muestra una visión esquemática de las distintas complicaciones del ictus a través de diferentes momentos de la historia natural del mismo, considerando la fase hiperaguda como las primeras 4,5-8 horas, ventana terapéutica para las terapias de reperusión, la fase subaguda como la estancia hospitalaria, y la fase crónica después del alta. En la parte superior de la figura se detallan los procesos asistenciales vinculados a cada fase.

### 1.2.1. Factores no modificables

La edad y la gravedad inicial del ictus han sido reconocidas como las principales características basales condicionantes del pronóstico del ictus [Weimar C, 2004]. De hecho, la simple suma de ambas variables ha demostrado ser un buen predictor pronóstico en pacientes tratados mediante trombolisis intravenosa, mediante la escala SPAN-100 (edad + NIHSS basal, considerándose positiva si es  $\geq 100$ ). En un subanálisis del ensayo clínico NINDS-tPA [The NINDS tPA study group, 1995], los pacientes SPAN-100 positivos tuvieron una mayor incidencia de transformación hemorrágica y menor incidencia de buen pronóstico, definido de acuerdo al ensayo clínico (mRS 0-1, NIHSS  $\leq 1$ , Barthel  $\geq 95$ , y Glasgow Outcome Scale score de 1 a los tres meses del ictus [Saposnik G, 2013]).

El caso de la edad como factor no modificable, condicionante del pronóstico del ictus, resulta de especial interés, dado que la edad avanzada es uno de los principales factores de riesgo de ictus [Wolf PA, 1991], y el envejecimiento de la población hace que en un futuro próximo sea previsible que nos enfrentemos a este problema con mayor frecuencia [Feigin VL, 2015]. Dado que los pacientes mayores de 80 años han sido excluidos en los principales ensayos clínicos de terapias de reperusión [Hacke W, 2008], los médicos nos hemos preguntado con frecuencia en qué medida los resultados de estos ensayos pueden ser aplicados a esta población. Análisis posteriores en grandes registros de ictus como el SITS-ISTR y el VISTA han demostrado que, a pesar del peor pronóstico en este grupo de edad, el beneficio de las terapias de reperusión se mantiene [Mishra NK, 2010].

## INTRODUCCIÓN

Además de edad y gravedad, otros factores como la situación funcional previa, la comorbilidad del paciente, la etiología del ictus o el tiempo transcurrido hasta que el paciente es atendido tienen importancia en el pronóstico del mismo. El caso del tiempo es de especial interés en los pacientes candidatos a terapias de reperfusión. Análisis combinados de los ensayos clínicos de trombolisis intravenosa han observado que el beneficio del rtPA es mucho mayor cuanto antes se administre, de forma que puede casi doblarse en eficacia cuando el fármaco es administrado en las primeras 1,5 horas con respecto a su administración entre 1,5 y 3 horas [Hacke W, 2004].

**Figura 2. Evolución de la escala de Rankin Modificada a los 90 días en análisis combinado de los ensayos clínicos NINDS, ECASS y ATLANTIS a través de las distintas ventanas temporales: De Hacke W, et al. Lancet 2004.**

Modified Rankin Scale 0-90 min	
	0 1 2 3 4 5 Death
Placebo (n=150)	10 19 13 12 21 5 21
rt-PA (n=161)	22 19 8 14 13 5 19
Modified Rankin Scale 91-180 min	
	0 1 2 3 4 5 Death
Placebo (n=315)	16 14 10 17 20 9 16
rt-PA (n=302)	18 25 7 14 11 8 17
Modified Rankin Scale 181-270 min	
	0 1 2 3 4 5 Death
Placebo (n=411)	11 21 11 16 20 10 12
rt-PA (n=390)	20 17 12 12 15 11 13
Modified Rankin Scale 271-360 min	
	0 1 2 3 4 5 Death
Placebo (n=508)	15 21 13 14 19 8 10
rt-PA (n=538)	18 19 12 12 15 9 15

0-90 min (n=311); 91-180 min (n=618); 181-270 min (n=801); 270-360 min (n=1.046).

### 1.2.2. Complicaciones de la fase hiperaguda

La trombolisis intravenosa con activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA), constituye el único tratamiento farmacológico aprobado para el tratamiento del ictus agudo [The NINDS tPA study group, 1995; Hacke W, 2008]. Además, en los últimos años hemos asistido a la publicación de los primeros ensayos clínicos randomizados, de fase III, que demuestran que el tratamiento endovascular del ictus es eficaz en pacientes seleccionados con oclusiones de arterias intracraneales [Berkhemer OA, 2015; Goyal M, 2015; Campbell BC, 2015; Jovin TG, 2015]. Desafortunadamente, los beneficios de estas terapias de reperfusión no llegan a todos los pacientes con ictus, dado el escaso margen temporal con el que deben ser aplicadas (4,5 horas en el caso del rt-PA intravenoso, hasta 8 horas para las terapias endovasculares), así como numerosas contraindicaciones. De hecho, durante el periodo de tiempo de realización del ensayo clínico REVASCAT (Noviembre de 2012 a Diciembre de 2014)

## INTRODUCCIÓN

[Jovin TG, 2015], recibieron algún tipo de terapia de reperfusión un total de 2.576 pacientes, constituyendo alrededor del 15% de un total de 17.596 pacientes con ictus isquémico atendidos en Cataluña durante este periodo de tiempo [Urrea X, 2015].

Algunos de los factores que condicionan el pronóstico del ictus tienen lugar durante estas primeras horas tras el inicio de los síntomas, estando en relación con la aplicación de terapias de reperfusión y sus efectos adversos. De hecho, la trombolisis intravenosa con tPA consigue la recanalización del vaso ocluido solamente en un 50% de los casos aproximadamente. Numerosos factores como la localización de la oclusión arterial, el tamaño y la composición del trombo, la presión arterial, la glucemia o la presencia de flujo residual son responsables de esta variabilidad [Saqqur M, 2007]. Pero incluso cuando se consigue la recanalización, el vaso puede volver a reocluidirse. La reoclusión de una arteria previamente recanalizada ha sido constatada mediante doppler transcraneal (DTC) estimándose una frecuencia del 34% de los pacientes en los que se consigue inicialmente la recanalización, y siendo responsable de deterioro neurológico y mal pronóstico funcional [Alexandrov AV, 2002]. Una mayor gravedad del ictus y la presencia de estenosis carotídea ipsilateral de alto grado han sido descritos como factores predictores de la ocurrencia de reoclusión arterial [Rubiera M, 2005].

Pero además de las complicaciones a nivel del vaso, la complicación más temida de las terapias de reperfusión es sin duda la transformación hemorrágica. El sangrado en la zona de tejido infartado puede presentarse de varias formas, desde la aparición de pequeñas hemorragias petequiales asintomáticas, hasta grandes hematomas intraparenquimatosos que condicionan efecto de masa y desplazamiento de línea media. En la ausencia de terapias de reperfusión, la transformación hemorrágica sintomática, entendiendo como tal aquella que produce deterioro neurológico, ha sido documentada aproximadamente en un 1,5% del total de los ictus isquémicos [Lindley R, 2004]. Esta incidencia aumenta claramente en pacientes tratados con tPA intravenoso, alcanzando hasta un 7% de los casos [Balami JS, 2011]. La definición más utilizada para considerar sintomática una transformación hemorrágica, y que utilizaremos en la presente tesis doctoral, es la definición del ensayo clínico ECASS, que la define como cualquier signo radiológico de hemorragia intracraneal que ocurre en las primeras 36 horas tras el tratamiento trombolítico y que se asocia a deterioro neurológico, es decir, aumento de 4 o más puntos en la escala NIHSS [Hacke W, 1998].

Sin embargo, no siempre la transformación hemorrágica del infarto es deletérea para el paciente. Se ha postulado que las pequeñas transformaciones hemorrágicas petequiales podrían ser marcadores de recanalización precoz y efectiva, asociándose de esta forma con un pronóstico favorable, mientras que la recanalización tardía se asociaría con el desarrollo de hematomas parenquimatosos, sintomáticos, que empeorarían el pronóstico del ictus [Molina CA, 2001; Molina CA, 2002]. Por tanto, si pudiésemos predecir que un paciente tiene un riesgo muy elevado de presentar una complicación hemorrágica grave tras el tratamiento con rt-PA, parecería razonable evitar este tratamiento, o bien utilizar alternativas como el uso de dosis bajas de rt-PA [Liu MD, 2015] o realizar directamente trombectomía mecánica. En este sentido, algunos factores clínicos se han asociado con el desarrollo de estas complicaciones, como la edad avanzada, la gravedad del ictus, niveles elevados de presión arterial al ingreso, hiperglucemia, diabetes, o la presencia de signos precoces de isquemia en la neuroimagen inicial [Lansberg MG, 2007; Khatri P, 2007]. Algunos autores han tratado de cuantificar el

## INTRODUCCIÓN

riesgo que presenta un paciente para desarrollar complicaciones hemorrágicas tras tratamiento trombolítico [Lou M, 2008; Menon BK, 2012; Strbian D, 2012], a través de escalas predictivas que se resumen en la [Tabla 2](#). Una reciente revisión de estas escalas concluyó que ninguna de ellas tiene el potencial suficiente como para permitir su uso clínico, aunque el mejor valor predictivo fue obtenido por la escala SEDAN [Strbian D, 2014].

**Tabla 3. Modelos predictivos de transformación hemorrágica. Adaptado de Bustamante A, et al. Eur J Intern Med 2015**

Nombre y referencia	Definición TH	N derivación	N validación	Variables	Puntos	Capacidad predictiva
<b>MSS</b> Cucciara et al, 2008	Cualquier TH THs (NINDS)	481	965	- Edad - NIHSS basal - Glucemia - Número de plaquetas	4	Cualquier TH: 0,69 THs: 0,68
<b>HAT</b> Lou et al, 2008	Cualquier TH THs (NINDS)	302	98	- NIHSS basal - Glucemia / Diabetes - Hipodensidad en TC basal - Edad	5	Cualquier TH: 0,72 (0,65-0,79) THs: 0,74 (0,63-0,84)
<b>SEDAN</b> Strbian et al, 2012	THs (ECASS II)	974	828	- NIHSS basal - Glucemia - Signos precoces de infarto - Signo de hiperdensidad arterial - Edad	6	0,77 (0,71-0,83)
<b>GRASPS</b> Menon et al, 2012	THs (NINDS)	7.169	3.073	- NIHSS basal - Glucemia - PAS - Etnia (Asiática) - Sexo (masculino) - Edad	101	Derivación: 0,71 (0,68-0,73) Validación: 0,70 (0,67-0,74)
<b>SITS</b> Mazya et al, 2012	THs (SITS-MOST)	15.814	15.813	- NIHSS basal - Glucemia - Antiagregantes plaquetarios - PAS - Peso - Tiempo hasta tratamiento - Historia de hipertensión	12	Derivación: 0,71 Validación: 0,69
<b>SPAN-100</b> Saponisk et al, 2013	THs (NINDS) Cualquier TH	-	312	- Edad - NIHSS basal	-	0,733 (THs) 0,682 (cualquier TH)

La capacidad predictiva está expresada como estadístico-C (área bajo la curva ROC del modelo predictivo), en los casos en que se suministra se incluye, entre paréntesis, el intervalo de confianza al 95%. TH: transformación hemorrágica; THs: transformación hemorrágica sintomática; N: tamaño muestral; NIHSS: escala de ictus del National Institutes of Health; NINDS: National Institutes of Neurological Disorders and Stroke; TC: tomografía cerebral; ECASS: European Corporative Acute Stroke Study; SITS-MOST: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke: A Multinational Multicentre Monitoring Study of Safety and Efficacy of Thrombolysis in Stroke; PAS: presión arterial sistólica.

Con respecto a la incidencia y consecuencias de la transformación hemorrágica en pacientes sometidos a tratamientos de reperusión endovascular, la información es algo más escasa. Un reciente estudio sobre una gran cohorte de 1.122 pacientes ha demostrado que, aparte de los factores relacionados con la transformación hemorrágica de los pacientes tratados por vía intravenosa, algunas particularidades derivadas de la propia terapia pueden favorecer el riesgo de transformación hemorrágica tipo hematoma parenquimatoso. Ejemplos de éstas serían la administración previa de rt-PA intravenoso, el mayor tiempo hasta el tratamiento o la administración de rt-PA intraarterial [Nogueira RG, 2015]. Llamen la atención, sin embargo, las bajas tasas de transformación hemorrágica sintomática en los recientes ensayos clínicos de tratamiento endovascular, que oscilan desde el 0% del EXTEND-IA [Campbell BC, 2015] al 7,7% del MR-CLEAN [Berkhemer OA, 2015], lo que podría poner de manifiesto que, con una

## INTRODUCCIÓN

adecuada selección de pacientes, el riesgo de esta temida complicación disminuye considerablemente.

### 1.2.3. Complicaciones de la fase subaguda

Pocas horas tras el ictus, si no se consigue la reperusión del tejido isquémico, se generan a nivel molecular fenómenos de estrés oxidativo, inflamatorios y de remodelación tisular que afectarán a la unidad neurovascular, tanto a nivel estructural como funcional [Hossmann KA, 2006]. Estos mecanismos conducen a una pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, que aumenta su permeabilidad permitiendo un mayor paso de líquido y proteínas séricas, que conducen a edema vasogénico [Wang CX, 2007]. Cuando la progresión del edema vasogénico es tal que genera una hipertensión intracraneal (HTIC) con desplazamiento de estructuras a través de la línea media cerebral, se produce lo que conocemos como infarto maligno. Afortunadamente estos infartos son poco frecuentes, representando alrededor del 10% de los infartos del territorio de la arteria cerebral media (ACM) y siendo extremadamente raros en otros territorios vasculares [Hacke W, 1996]. Su historia natural, por el contrario, es catastrófica, pues en ausencia de tratamiento específico implican cifras de mortalidad de hasta el 80%, con grandes tasas de discapacidad en los supervivientes [Treadwell SD, 2010]. Los pacientes jóvenes son más propensos a desarrollar infartos malignos de la ACM, dada la escasa cuantía de espacio compensatorio que presentan debido a la ausencia de atrofia cerebral [Heiss WD, 2016].

El edema maligno con HTIC ha sido reconocido como una de las complicaciones del ictus con más importancia en términos de morbi-mortalidad, sobre todo a nivel intrahospitalario. De hecho, en el estudio del Registro de Ictus de Berlín (Berlin Stroke Register Study) [Koennecke HC, 2011], hasta una cuarta parte de las muertes en pacientes con estancia hospitalaria menor a una semana fueron atribuidas al edema cerebral con HTIC, comportándose como un predictor independiente de mortalidad hospitalaria. Afortunadamente, esta grave complicación del ictus dispone de un tratamiento específico que he demostrado mejorar la mortalidad y la situación funcional de los pacientes que lo padecen, al menos en pacientes menores de 60 años, como es la hemicraniectomía descompresiva [Vahedi K, 2007]. Por tanto, teniendo en cuenta además que el tratamiento es más eficaz cuando la cirugía se realiza de forma precoz, resultaría interesante predecir qué pacientes son más propensos a desarrollar un infarto maligno. En este sentido, un volumen de infarto mayor de 145 centímetros cúbicos en la secuencia de difusión (DWI) de resonancia magnética cerebral ha demostrado ser un biomarcador sensible y específico, utilizándose a día de hoy en la práctica clínica [Wartenberg KE, 2012].

La otra complicación neurológica típica de la fase subaguda del ictus, aunque pueda aparecer en cualquier momento de la historia natural de la enfermedad, es el desarrollo de crisis epilépticas secundarias a la lesión cerebral. No en vano, el ictus representa una de las causas epileptógenas más importantes, siendo la primera en importancia en el anciano [Hauser WA, 1992]. En este nivel, distinguimos en primer lugar aquellas crisis consideradas como agudas sintomáticas, que aparecen en las dos primeras semanas tras el ictus y no implican necesariamente el desarrollo de epilepsia [Commission on classification and terminology of the



## INTRODUCCIÓN

[ILAE, 1981]. Se ha estimado que su incidencia está en torno al 8,9%, siendo más frecuentes tras ictus hemorrágicos o con afectación cortical [Beghi E, 2011]. Cuando las crisis aparecen más allá de esta fase subaguda, hablamos de epilepsia post-ictus. De acuerdo al estudio Seizures After Stroke Study (SASS), la incidencia de epilepsia de nueva aparición tras el ictus se ha estimado en un 2,5% de los casos en los seis primeros meses tras el evento [Bladin C, 2000]. La aparición tardía de la primera crisis, más allá de las dos primeras semanas tras el ictus, o la presencia de infartos corticales discapacitantes, han sido reconocidos como factores predictores de epilepsia tras un ictus.

Una mayor mortalidad, mayor estancia media y mayores tasas de discapacidad son las consecuencias de las crisis epilépticas tras el ictus, tanto para las crisis agudas sintomáticas como para la epilepsia post-ictus. Aunque el tratamiento profiláctico con anticomiciales no se recomienda actualmente para los pacientes con ictus [Burneo JG, 2010], algunos de estos fármacos han demostrado ser útiles y seguros en el tratamiento de las crisis comiciales en los pacientes con ictus [Álvarez-Sabín J, 2002].

Además de las complicaciones neurológicas de la fase subaguda del ictus, de las cuales el edema y las crisis comiciales serían las principales representantes, en este periodo pueden aparecer complicaciones a nivel sistémico, que pueden resultar en aumento de estancias hospitalarias y costes [Kumar S, 2010]. En este contexto, podemos distinguir por una parte las complicaciones en relación con las comorbilidades del paciente, como serían las complicaciones cardiológicas. Por otra parte, otras complicaciones estarían más en relación con el propio ictus y la nueva condición del paciente que implica disfagia, inmovilidad, uso de dispositivos médicos, etc. Ejemplo de estas últimas serían la infección asociada al ictus o el tromboembolismo venoso.

Ictus y cardiopatía isquémica comparten algunos de sus principales factores de riesgo, representando además cardiopatías como la fibrilación auricular o la cardiopatía isquémica alguna de las principales etiologías del ictus. Además, en la fase aguda del ictus, los desequilibrios existentes en el control de la homeostasis y el control autonómico pueden provocar complicaciones cardíacas como las arritmias [Kumar S, 2010]. Globalmente, las complicaciones cardíacas del ictus son las responsables de entre un 2 y un 6% de la mortalidad a los tres meses del ictus [Adams RJ, 2003]. Estudios basados en los archivos VISTA (Virtual International Stroke Trials Archive) indican que el riesgo de complicaciones cardíacas es máximo en las dos primeras semanas tras el evento. En este estudio además se identifican algunos factores como los principales predictores de complicaciones cardiológicas, como son la historia de insuficiencia cardíaca congestiva, la diabetes, niveles basales elevados de creatinina, gravedad del ictus o parámetros electrocardiográficos como el segmento QT largo o las extrasístoles ventriculares [Prosser J, 2007]. La identificación de los pacientes más propensos a sufrir complicaciones cardíacas podría resultar interesante para el neurólogo clínico, ya que estos pacientes podrían beneficiarse de medidas como una monitorización prolongada durante la estancia o un estudio cardiológico más detallado.

La cardiopatía isquémica representa una frecuente comorbilidad del ictus, sobre todo en algunos subtipos etiológicos. Por ejemplo, estudios en nuestro medio han estimado una prevalencia de isquemia miocárdica silente superior al 50% en pacientes con estenosis

## INTRODUCCIÓN

sintomáticas de las arterias intracraneales [Arenillas J, 2005]. El infarto de miocardio sucede en el ictus hasta en un 2,3% de los casos durante la propia hospitalización, teniendo los pacientes con cardiopatía isquémica establecida, diabetes o arteriopatía periférica un riesgo mayor, así como los ictus más graves [Liao J, 2005]. Además, tras el alta hospitalaria, los supervivientes de un ictus tienen un alto riesgo (hasta un 2% anual) de sufrir un infarto de miocardio, representando una importante causa de morbilidad y mortalidad [Touze E, 2005].

Además de la cardiopatía isquémica, otras cardiopatías pueden complicar el curso del ictus como son las arritmias [Rem JA, 1985], especialmente frecuentes cuando el infarto afecta la ínsula o el bulbo raquídeo [Daniele O, 2002], la insuficiencia cardiaca congestiva [Prosser J, 2007] o el síndrome de Takotsubo, documentado hasta en un 1-2% de los pacientes con ictus durante las primeras semanas tras el evento [Bybee KA, 2004].

Las infecciones en pacientes con ictus representan una de las complicaciones más importantes del mismo. Los diferentes estudios han documentado cifras de incidencia altamente variables, entre un 5 y un 65%, aunque un reciente metanálisis cifra la misma en un 30% (24-36%) [Westendorp WF, 2011]. Las infecciones más comunes son las infecciones respiratorias y urinarias, con una incidencia similar, aunque sin duda son las infecciones respiratorias las que mayor impacto tienen sobre el pronóstico del ictus. De hecho, se estima que a la neumonía asociada al ictus corresponde el mayor riesgo atribuible de muerte en el ictus agudo, suponiendo la causa final de hasta un tercio de los fallecimientos [Heuschmann PU, 2004]. Además los pacientes que desarrollan neumonía durante el ingreso tienen un incremento de riesgo de hasta un 70% de precisar cuidados especiales al alta hospitalaria y representan un alto coste para el sistema sanitario [Katzan IL, 2003; Katzan IL, 2006]. A pesar de estos datos, aún existe discusión acerca de si la infección asociada al ictus representa un factor condicionante de mal pronóstico en si misma o solamente es un marcador de gravedad del ictus, de forma que los pacientes que sufren infecciones son aquellos con ictus más graves, y solo por este hecho tendrán mal pronóstico, independientemente de sufrir o no una infección [Vargas M, 2006].

Dada la alta incidencia y la importancia de las infecciones como causa de mortalidad y discapacidad en el ictus, así como los posibles efectos neuroprotectores de algunos grupos de antibióticos [Meisel C, 2004], el uso de antibioterapia profiláctica en el ictus ha sido evaluado en varios ensayos clínicos. Tras los resultados de un metanálisis en el que la antibioterapia demostró una reducción del total de infecciones (de un 36% a un 22%) pero sin efectos sobre el pronóstico funcional o la mortalidad [Westendorp WF, 2012], dos grandes ensayos clínicos han sido publicados recientemente. El primero de ellos, el PASS (Preventive Antibiotics in Stroke Study) [Westendorp WF, 2015], ha demostrado una reducción de infecciones, aunque sin efectos sobre el pronóstico funcional o la mortalidad. Algunas críticas sobre el diseño de este ensayo han sido la inclusión de todo tipo de pacientes en lugar de los más propensos a sufrir infecciones o la elección del antibiótico, ceftriaxona. Más recientemente hemos conocido los resultados del ensayo STROKE-INF, evaluando el uso de antibioterapia preventiva en pacientes seleccionados por la presencia de disfagia, con antibióticos a la elección del médico responsable del paciente [Kalra L, 2015]. En este estudio la antibioterapia preventiva no ha demostrado reducir el riesgo de neumonía ni mejorar el pronóstico funcional.

## INTRODUCCIÓN

Entre los factores que se han asociado al desarrollo de complicaciones infecciosas, la edad avanzada, una mayor gravedad del ictus o un mayor volumen lesional en resonancia magnética han sido descritos como predictores de infección [Sellars C, 2007], aunque sin duda el predictor más importante, cuando hablamos de neumonía asociada al ictus, es la presencia de disfagia [Perry L, 2001]. Además, se han desarrollado algunos modelos predictivos para evaluar el riesgo de neumonía en pacientes con ictus, y se muestran en la tabla 4. Aunque estos scores están basados en cohortes retrospectivas y necesitarían ser confirmados en estudios prospectivos, el uso de estos modelos representa una estrategia prometedora para identificar a los pacientes con mayor riesgo de sufrir una infección.

**Tabla 4. Modelos predictivos de neumonía asociada al ictus. Adaptado de Bustamante A, et al. Eur J Intern Med 2015**

Nombre y referencia	N derivación	N validación	Variables	Puntos	Capacidad predictiva
<b>PNEUMONIA</b> Kwon et al, 2006	286	-	- Edad - Sexo (masculino) - NIHSS basal - Ventilación mecánica - Disfagia	5	-
<b>CHUMBLER</b> Chubler et al, 2010	925	438	- Edad - Test de deglución alterado - Encontrado en el suelo al inicio - Historia previa de neumonía	5	Derivación: 0,78 Validación: 0,76
<b>A2DS2</b> Hofmann et al, 2012	15.335	45.085	- Edad - Fibrilación auricular - Disfagia - Sexo (masculino)	10	0,84 (0,83-0,85)
<b>PANTHERIS*</b> Harms et al, 2013	335	112	- NIHSS basal - GCS basal - Edad - PAS>200 mmHg - Recuento leucocitario (>11.000/ $\mu$ L)	12	0,85 (0,80-0,91)
<b>AIS-APS</b> Ji et al, 2013	8.820	Interna: 5.882 Externa: 3.037	- Edad - Comorbilidades - mRS previo >2 - NIHSS basal - GCS basal - Disfasia - OCSP - Glucemia basal	34	Val. interna: 0,785 (0,77-0,80) Val. externa: 0,79 (0,76-0,82)
<b>ISAN</b> Smith et al, 2015	11.551	11.648	- mRS previo >2 - Sexo (masculino) - Edad - NIHSS basal	22	Derivación: 0,79 (0,77-0,81) Validación: 0,78 (0,76-0,80)

*La capacidad predictiva está expresada como estadístico-C (área bajo la curva ROC del modelo predictivo), en los casos en que se suministra se incluye, entre paréntesis, el intervalo de confianza al 95%. N: tamaño muestral; NIHSS: escala de ictus del National Institutes of Health; GCS: escala del coma de Glasgow (Glasgow coma scale); PAS: presión arterial sistólica; mRS: escala de Rankin modificada; OCSP: Oxfordshire Classification Stroke Project, clasificación clínico-topográfica del ictus.*

*\*Score desarrollado para la predicción de neumonía asociada al ictus a nivel de unidades de cuidados intensivos.*

El tromboembolismo venoso también representa una preocupación importante para los neurólogos en las unidades de ictus, ya que la prevalencia del mismo puede alcanzar hasta un 50% en la extremidad parética en ausencia de tromboprolifaxis [Brandstater ME, 1992]. El tromboembolismo venoso se desarrolla habitualmente en las 2-3 primeras semanas tras el ictus y, en un 15% de los casos, puede complicarse con un tromboembolismo pulmonar [Kelly J, 2004]. Edad avanzada, gravedad del ictus, parálisis de miembros y deshidratación han sido descritos como factores de riesgo de tromboembolismo venoso [Kelly J, 2004(2)]. Afortunadamente, medidas como la profilaxis con heparinas de bajo peso molecular o la

## INTRODUCCIÓN

compresión neumática intermitente son efectivas en la prevención de esta complicación [Dennis M, 2013].

Otra frecuente complicación del ictus que no ha recibido mucha atención por parte de los investigadores es el síndrome confusional agudo o delirium, que consiste en la alteración aguda de las funciones cerebrales superiores acompañado de una afectación del nivel de conciencia, de curso fluctuante [Lipowski Z, 1990]. A pesar de que el delirium representa una frecuente complicación en pacientes hospitalizados, en los pacientes con ictus su frecuencia es aún mayor, entre el 13 y el 48% frente a un 10-25% en unidades de medicina interna [Oldenbeuving AW, 2007]. La edad avanzada, infecciones concurrentes y deterioro cognitivo preexistente son condiciones predisponentes [Fick DM, 2002]. Un metanálisis sugiere una asociación entre la ocurrencia de delirium y un empeoramiento del pronóstico, con mayores estancias hospitalarias y peores cifras de mortalidad y discapacidad [Shi Q, 2012], aunque la influencia de factores de confusión como la gravedad del ictus o la edad en esta asociación no han sido correctamente estudiadas.

### 1.2.4. Complicaciones de la fase crónica

El entorno del paciente con ictus tras el alta hospitalaria engloba un rango de escenarios muy diferentes, fundamentalmente en función de la situación funcional que tiene el paciente en el momento del alta hospitalaria. Las complicaciones del ictus en este periodo también serán dependientes de este aspecto. En este sentido, podemos diferenciar como extremos, por una parte, el paciente que tras el ictus permanece en una situación de independencia funcional, en el que los esfuerzos terapéuticos irán dirigidos fundamentalmente a evitar la recurrencia de nuevos ictus y otros eventos cardiovasculares. El otro extremo estaría representado por el paciente gravemente discapacitado, que raramente podrá volver a su domicilio y tendrá que ser atendido en centros específicos, y en el que las complicaciones derivadas de la nueva condición serán las protagonistas del proceso asistencial, sin obviar por otra parte los aspectos de prevención secundaria. Dada la ausencia de estudios que hayan determinado la importancia de estas complicaciones conjuntamente en nuestro medio, las complicaciones propias de la fase crónica no serán objeto de la presente tesis doctoral, aunque las enumeraremos y describiremos brevemente su importancia a continuación.

La recurrencia del ictus tiene un claro impacto sobre el pronóstico funcional y vital del mismo. El mayor riesgo de recurrencia tras un ictus se ha documentado durante los primeros tres meses [Burn J, 1994], siendo este mucho mayor durante las primeras dos semanas tras el evento inicial, y decreciendo posteriormente. El subtipo etiológico del ictus, la historia reciente de un evento transitorio o un ictus establecido previo son los principales predictores de recurrencia de acuerdo a un gran estudio que incluyó 1.458 pacientes seguidos durante tres meses tras un primer ictus [Ay H, 2010]. Sin embargo, a pesar de que el riesgo de recurrencia es mucho mayor en los primeros días y meses, la prevención secundaria tras un ictus debe ser mantenida de por vida. Un manejo apropiado de los factores de riesgo vascular podría reducir el riesgo de sufrir un nuevo ictus en un 70-80% [Yusuf S, 2002], aunque generalmente el grado de cumplimiento y de consecución de objetivos de las estrategias de prevención secundaria es subóptimo, incluso con un cumplimiento terapéutico correcto [Touze E, 2008].

## INTRODUCCIÓN

Como ocurre con la recurrencia, otras complicaciones cuya importancia emerge en la fase crónica del ictus ya están presentes en los estados más subagudos. De hecho, los efectos neurológicos y funcionales del evento tales como paresia de miembros, disfagia o encamamiento prolongado pueden contribuir al desarrollo de infecciones o eventos tromboembólicos venosos, al igual que ocurría en la fase subaguda. También estos problemas pueden predisponer a sufrir caídas y fracturas, frecuentes complicaciones en pacientes ancianos que han sufrido un ictus, y que conllevan un aumento de la discapacidad y de la mortalidad [Kumar S, 2010]. Estas fracturas también se relacionan de algún modo con la sarcopenia, ya que la debilidad muscular que ocurre en el lado parético del ictus lleva a una combinación de anomalías musculares como denervación, desuso, remodelamiento y espasticidad que resultan en atrofia muscular. Es conocido que los cambios estructurales en el tejido muscular comienzan a las pocas horas del daño cerebral, de forma que, en la primera semana tras el ictus, la atrofia muscular ha comenzado ya a desarrollarse no solo en el miembro parético, sino también en el contralateral [Scherbakov N, 2013]. La rehabilitación con entrenamiento de la fuerza es una modalidad que podría utilizarse para reducir los efectos de la atrofia muscular tras el ictus [Gray V, 2012].

Aunque el impacto de algunas de las complicaciones propias de la fase crónica no es conocido, en términos de mortalidad o discapacidad, algunas de ellas están claramente relacionadas con una pérdida de calidad de vida por parte del paciente que las sufre. Por ejemplo, el dolor tras el ictus es común, habiéndose estimado que puede ocurrir hasta en un tercio de los pacientes [Jonsson AC, 2006]. Además, al ser multifactorial en su etiología, su manejo resulta aún más complejo, pues su causa puede tener desde un origen central hasta anomalías puramente mecánicas por posturas corporales anormales, o representar simplemente el empeoramiento de un dolor preexistente [Andersen G, 1995].

Depresión y fatiga son dos complicaciones frecuentemente coexistentes en la fase crónica del ictus, con un claro efecto sobre la calidad de vida del paciente que las sufre. La incidencia de fatiga se ha documentado en más de un 60% de los pacientes, estando en relación con la coexistencia de depresión y discapacidad [Ingles JL, 1999; Choi-Kwon S, 2005]. La frecuencia de la depresión tras el ictus ha sido estimada por un metanálisis en un 29% (25-32%), permaneciendo en estas cifras hasta diez años tras el ictus [Ayerbe L, 2013]. Factores de riesgo de la misma serían edades menos avanzadas, sexo femenino y mayor discapacidad [Hackett ML, 2005]. La depresión a los tres meses del ictus se ha asociado a un aumento en la mortalidad y un empeoramiento de la calidad de vida [Ayerbe L, 2014].

Finalmente, el ictus es una de las causas más importantes de deterioro cognitivo. El deterioro cognitivo de tipo vascular se define como la alteración cognitiva asociada a la enfermedad cerebrovascular, que puede oscilar desde leves déficits en la cognición hasta una franca demencia, en la que existe evidencia clínica o subclínica de patología cerebrovascular, y que afecta al menos un dominio cognitivo mayor [Gorelick PB, 2011]. Su incidencia tras el ictus no es conocida, pero en un estudio reciente incluyendo 1.572 pacientes en situación funcional previa al ictus de independencia funcional, la incidencia de deterioro cognitivo a los tres meses del ictus fue del 38% [Ankolekar S, 2014], siendo la edad avanzada, la gravedad del ictus, el ritmo cardiaco y la presencia de atrofia cerebral en la neuroimagen los principales predictores del desarrollo de deterioro cognitivo. La identificación precoz de los pacientes con un alto

## INTRODUCCIÓN

riesgo de desarrollar problemas cognitivos tras el ictus podría ser de interés, ya que las terapias de rehabilitación, el manejo agresivo de los factores de riesgo vascular o algunas terapias farmacológicas puede ser útiles para frenar o mejorar este deterioro cognitivo [Gillespie DC, 2015; Douiri A, Álvarez-Sabín J, 2013].

### 1.3. PREDICCIÓN DEL PRONÓSTICO GLOBAL DEL ICTUS

La predicción del pronóstico del ictus en términos de mortalidad, mejoría o empeoramiento neurológico o discapacidad representa un reto para neurólogos e investigadores. Una estimación anticipada y precisa acerca de qué pacientes van a mejorar o empeorar en las siguientes horas, cuáles presentan un mayor riesgo de morir a consecuencia del ictus, o cuáles estarán discapacitados meses después del evento podría ser utilizada para guiar la toma de decisiones en la práctica clínica, por ejemplo, a la hora de dar información más precisa al paciente o familiares, a la hora de optimizar recursos que en algunos lugares son escasos, como las unidades de ictus, o a la hora de indicar terapias potencialmente agresivas.

La predicción del pronóstico del ictus mediante variables clínicas ha sido explorada por numerosos autores, de forma que hoy en día existen varios modelos predictivos para la predicción de la mortalidad por ictus y la situación funcional de los pacientes a largo plazo [Ntaios G, 2012; Strbian D, 2013; Saposnik G, 2011; O'Donnell MJ, 2012], presentando algunos de ellos capacidades de predicción superiores al 80%. La mayoría de estos modelos, contruidos en forma de score, incluyen la edad y la gravedad basal del ictus como principales factores, aunque también integran otras variables no tan fácilmente obtenibles o medibles, como parámetros radiológicos. Modelos más sencillos como la previamente mencionada escala SPAN-100 no ofrecen tan buena capacidad predictiva, de forma que la predicción de mal pronóstico resulta infra- estimada [Saposnik G, 2013]. Además, la previsión es menos precisa en algunos subgrupos de ictus, como los pacientes con ictus leves [Teale EA, 2012]. Todas estas limitaciones hacen que estos scores no sean utilizados en la práctica clínica salvo con fines de investigación. Una completa revisión de los modelos predictivos para el pronóstico del ictus está disponible en el anexo 7.1 de la presente tesis doctoral.

Pero sin duda la principal complicación que plantea la predicción del pronóstico del ictus desde un punto de vista global es la utilidad limitada que el neurólogo clínico puede hacer de ellos, ya que, aunque una predicción del pronóstico global pueda ser de utilidad, si pudiésemos predecir no sólo el resultado sino el mecanismo que lleva a éste, es decir, las complicaciones del ictus, el impacto de actuar sobre ellas sería aún mayor.

### 1.4. BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN EL ICTUS

La Organización Mundial de la Salud define un biomarcador como aquella sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o sus productos, y que puede influenciar o predecir la incidencia o el resultado de una enfermedad. En un sentido más amplio, podemos entender un biomarcador como una característica que puede ser medida de forma objetiva, y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o la

## INTRODUCCIÓN

respuesta a una intervención terapéutica [Biomarkers Definitions Working Group, 2001]. De forma general, parece razonable pensar que los biomarcadores también pueden informarnos acerca de una relación fisiopatológica entre el proceso indicado y el propio biomarcador, pero este requisito no es indispensable.

Existen diversos tipos de biomarcadores que pueden ser utilizados en la toma de decisiones en la práctica clínica con los pacientes con ictus, como los parámetros de neuroimagen. Por otra parte, los biomarcadores moleculares, generalmente proteicos, aportan algunas ventajas sobre la neuroimagen, como son la inocuidad (algunas exploraciones radiológicas requieren del uso de radiaciones ionizantes o la administración de medios de contraste), los menores requisitos técnicos y humanos que son precisos para su uso o su precio. Estos biomarcadores moleculares pueden ser estudiados principalmente en sangre, aunque también en otros fluidos como saliva o líquido cefalorraquídeo. En esta tesis doctoral profundizaremos en el estudio de diversos marcadores sanguíneos, por lo que nos referiremos a ellos como biomarcadores de aquí en adelante.

Hasta el presente, la mayoría de biomarcadores estudiados en pacientes con ictus han sido seleccionados siguiendo razonamientos lógicos e hipótesis dirigidas, se trata de biomarcadores candidatos, por estar asociados con una vía fisiopatológica importante en el ictus. En este sentido, biomarcadores en relación con procesos como la inflamación [Smith CJ, 2004; Montaner J, 2006 (2)], el remodelado tisular [Montaner J, 2003], la coagulación y la fibrinólisis [Ribó M, 2004], la patología cardíaca [Montaner J, 2008] o aquellos presentes en células del sistema nervioso central [Foerch C, 2006] han sido estudiados en pacientes con ictus, encontrándose en general alterados con respecto a controles sanos y asociados con diversas indicaciones, como el diagnóstico [Montaner J, 2011], la etiología [Llombart V, 2015], la respuesta al tratamiento trombolítico [Hernández-Guillamón, 2010] o el pronóstico [Bustamante A, 2014].

A pesar de estos resultados, cuando trabajamos con biomarcadores seleccionados corremos el riesgo de cometer un sesgo de selección, por lo que en los últimos años ha ido creciendo el interés por técnicas de alto rendimiento capaces de hacer grandes procesos de screening, evitando cometer este sesgo de selección y generando amplias listas de moléculas para ser evaluadas. En el campo de los biomarcadores, las principales técnicas empleadas son las librerías de anticuerpos [García-Berrocoso T, 2014] o las técnicas de proteómica mediante espectrometría de masas [Cuadrado E, 2010; Dayon L, 2011; Martínez-Morillo E, 2014]. Sin embargo, estas aproximaciones deben ser evaluadas con cautela, ya que no existe un amplio consenso sobre qué correcciones estadísticas y que umbrales deben aplicarse para evitar falsos positivos [Mellic GD, 2010; Abu-Asab MS, 2011].

A pesar de estas aproximaciones, hay en día aún no se utiliza ningún biomarcador sanguíneo en la práctica clínica para el manejo de los pacientes con ictus. Profundizar en qué indicaciones son las más interesantes para los propios neurólogos a la hora de utilizar biomarcadores resultaría de gran interés. El consorcio europeo IBCD (International Biomarker in Cerebrovascular Diseases Consortium, <http://stroke-biomarkers.com/page.php?title=Network>) fue fundado en 2011 con el objeto de ser una red multidisciplinaria de investigación translacional sobre los biomarcadores en el ictus, y tiene como uno de sus principales



## INTRODUCCIÓN

objetivos establecer las principales indicaciones para el futuro uso de biomarcadores en la práctica clínica, de forma que se pueda focalizar la investigación hacia estas indicaciones.

### 1.5. PREDICCIÓN DEL PRONÓSTICO DEL ICTUS MEDIANTE BIOMARCADORES SANGUÍNEOS

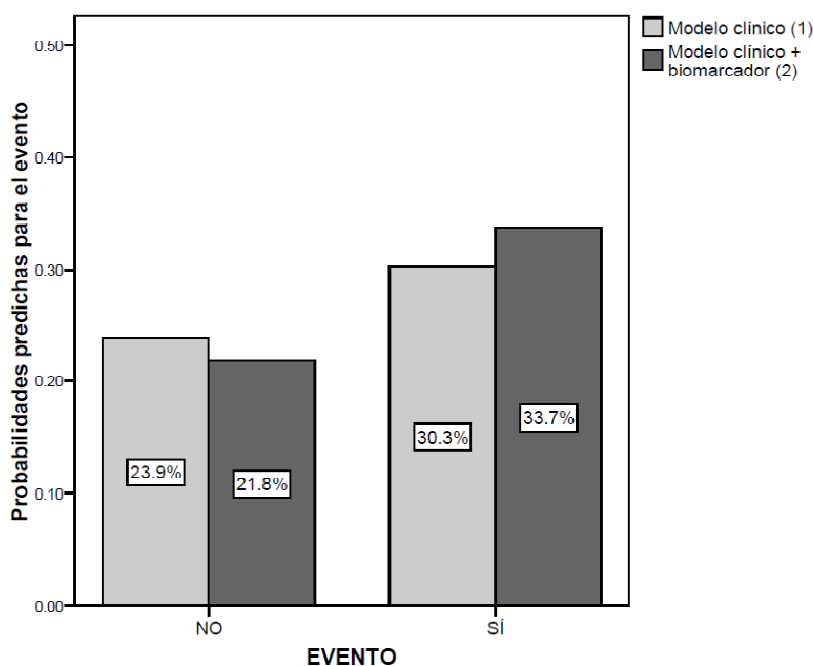
En el campo de la predicción del pronóstico del ictus, los biomarcadores sanguíneos representan un modo de añadir información objetiva a unas variables clínicas, de forma que resulten en una predicción más precisa sobre el resultado final del ictus. Existen numerosos estudios que han correlacionado los biomarcadores sanguíneos con el pronóstico del ictus, habiéndose publicado además varias revisiones sobre el tema [[Whiteley W, 2009](#); [Katan M, 2011](#); [Bustamante A, 2014 \(2\)](#)]. Estas revisiones concluyen que, de forma general, la mayoría de los estudios se han basado en pequeñas poblaciones, utilizando tamaños muestrales insuficientes, y tienen limitaciones desde el punto de vista estadístico, ya que muchas veces no van más allá de establecer una relación como predictores independientes en análisis de regresión logística, mediante la odds ratio (OR) o su capacidad predictiva mediante áreas bajo las curvas Características Operativas del Receptor (Curvas ROC). Pero estas medidas son claramente insuficientes a la hora de evaluar si un biomarcador añade o no algún valor predictivo sobre las variables clínicas que sabemos asociadas con mal pronóstico en el ictus.

Una forma de cuantificar la capacidad discriminativa de un biomarcador sobre un modelo predictivo integrado por variables clínicas es el índice integrado de mejoría de la discriminación (IDI), que provee un valor numérico a la diferencia existente entre las probabilidades predichas para dos modelos, además de un nivel de significación estadística. En nuestro caso, los dos modelos estarán compuestos por variables clínicas el primero y por las mismas variables clínicas más el biomarcador o los biomarcadores a estudio el segundo [[Pencina MJ, 2008](#)]. Esta diferencia es expresada globalmente, así como para eventos y no eventos (mortalidad, discapacidad o empeoramiento serían los eventos en el caso de la predicción del pronóstico), de forma que podemos distinguir si nuestro modelo con el biomarcador mejora al modelo clínico en términos de sensibilidad (mejor discriminación de eventos, reducción de falsos negativos), especificidad (mejor discriminación de no eventos, reducción de falsos positivos), o ambos. El índice puede representarse como un gráfico de barras, siendo más fácilmente interpretable.



## INTRODUCCIÓN

**Figura 3. Índice integrado de mejoría de la discriminación (IDI). Adaptado de Bustamante A, et al. Int J Stroke 2015**



La figura representa la comparación entre dos modelos predictivos, con y sin biomarcador. Las barras grises representan las probabilidades predichas para el modelo clínico (1) para un determinado evento, mientras que las barras oscuras representan las probabilidades predichas cuando el biomarcador es añadido sobre el mismo modelo clínico (2). El IDI resulta de la suma de la reducción de no-eventos y el aumento de eventos del modelo que incluye el biomarcador sobre el modelo clínico, siendo en este caso de 5,5% (1,4%-9,7%),  $p=0,009$ .

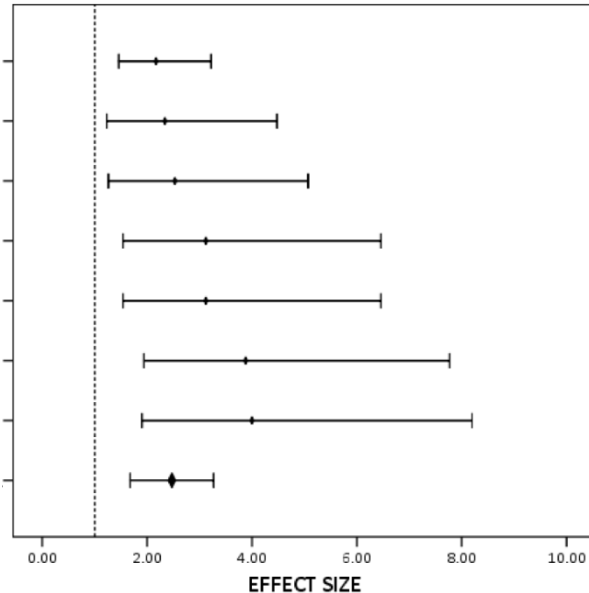
Esta evaluación del valor adicional de los biomarcadores, por desgracia, no ha sido la regla en los estudios de biomarcadores, de forma que, según nuestro conocimiento, solo el estudio CoRisk ha demostrado el valor predictivo adicional de un biomarcador sobre variables clínicas en una gran población de pacientes con ictus [De Marchis GM, 2013], mientras que otros biomarcadores clásicamente asociados a pronóstico como la interleucina 6 (IL-6) o el péptido natriurético tipo B (BNP) no han demostrado un valor predictivo adicional [Whiteley W, 2012; Montaner J, 2012]. En el estudio CoRisk, la copeptina demostró un valor adicional en la predicción de mal pronóstico funcional y mortalidad a los tres meses sobre un modelo clínico conformado por la edad y la NIHSS basal, en una muestra de 783 pacientes con ictus de menos de 24 horas de evolución. Estudios con menores tamaños muestrales sí han evaluado sistemáticamente este valor predictivo adicional, aunque la validez de estos métodos estadísticos en pequeñas poblaciones es más cuestionable.

Dado que los estudios de biomarcadores plasmáticos en grandes poblaciones son costosos y requieren grandes esfuerzos, un posible paso previo a la realización de grandes estudios prospectivos para la validación de resultados previos es la realización de metanálisis sobre la asociación de un biomarcador y el pronóstico del ictus. Más aún, si además de realizar un metanálisis a nivel de los estudios incluidos, es posible fusionar datos de pacientes individuales en una sola cohorte, podemos evaluar el valor predictivo de nuestros biomarcadores en

## INTRODUCCIÓN

grandes poblaciones sin necesidad de hacer un gran desembolso económico [Stewart CB, 2012].

**Figura 4. Resultados globales de un metanálisis a nivel de estudios. Adaptado de Bustamante A, et al. Expert Rev Neurother, 2014.**

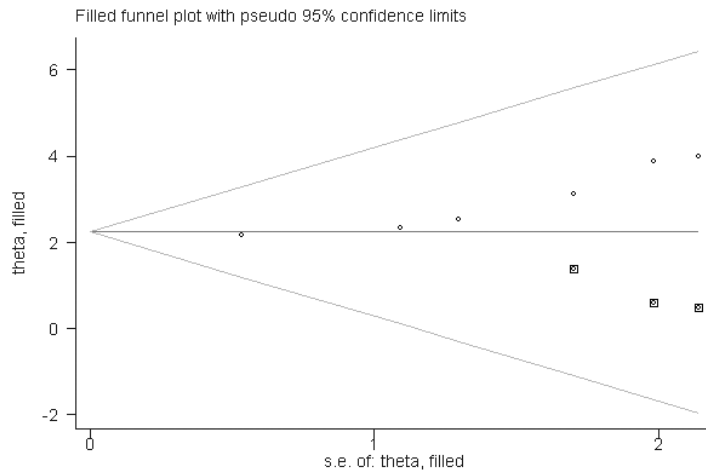


*Ejemplo de forest plot. Las líneas horizontales representan las odds ratios e intervalos de confianza al 95% para la asociación del biomarcador con la variable independiente para cada estudio, representando la última línea el efecto combinado de todos los estudios conjuntamente.*

Aunque estos estudios presentan obvias limitaciones, desde las propias de los estudios incluidos hasta la heterogeneidad de los mismos, que a veces nos obliga a estandarizar los resultados de los biomarcadores para mitigar las diferencias entre estudios; también presentan grandes ventajas, además de la ya comentada del tamaño muestral. En primer lugar, nos permiten evaluar la existencia de sesgos de publicación y, en caso de que este exista, corregir el efecto por este sesgo. Esto resulta de especial interés para obtener una visión global acerca de la asociación de nuestro biomarcador con el evento, ya que los artículos negativos son más difíciles de publicar que los positivos, alcanzando menor impacto en las revistas científicas. La ausencia de publicaciones de resultados negativos puede conducir a una sobreestimación del efecto del biomarcador, mientras que la publicación de estos resultados ahorraría recursos, además de dar un punto de vista más realista [Tzoulaki I, 2013].

## INTRODUCCIÓN

**Figura 5. Representación gráfica del sesgo de publicación mediante un funnel plot. Adaptado de Bustamante A, et al. Expert Rev Neurother, 2014.**



Las líneas horizontales representan el efecto global sobre la variable independiente, y las líneas diagonales el intervalo de confianza al 95%. Los círculos son obtenidos del efecto de cada estudio y su error estándar, mientras que los cuadros representan estudios estimados que compensan el efecto de los publicados para que se obtenga el efecto determinado. La presencia de estos últimos indica la existencia de un sesgo de publicación.

En segundo lugar, la revisión sistemática nos permite evaluar la calidad de los estudios publicados. En los metanálisis incluidos en la presente tesis doctoral, hemos utilizado un cuestionario de 15 puntos [García-Berrococo T, 2013], adaptado al uso de biomarcadores en el ictus. Finalmente, también destacar que la elaboración de un metanálisis para herramientas diagnósticas permite otorgar a las mismas un nivel de evidencia clase II para la indicación, de acuerdo a la clasificación de evidencia para medidas diagnósticas y terapéuticas [ESO Executive Committee, 2008].

### 1.6. PREDICCIÓN DE LAS COMPLICACIONES DEL ICTUS MEDIANTE BIOMARCADORES SANGUÍNEOS

Por lo expuesto en el punto anterior, el uso que clínicamente podríamos hacer de un biomarcador que se nos asociase con una variable pronóstico como mortalidad o discapacidad sería bastante limitado, dado que este puede estar determinado por asociación con las variables basales no modificables que determinan el pronóstico del ictus (edad, gravedad), así como por la dificultad de instaurar una medida terapéutica que condicione y modifique un pronóstico tan global. En este sentido, resulta de especial interés evaluar la utilidad de los biomarcadores sanguíneos en la predicción de factores condicionantes del pronóstico que sean, en alguna medida, prevenibles o tratables, y en los que la alteración en los niveles sanguíneos del biomarcador nos alerte de una posible complicación y nos lleve a actuar contra ella.

## INTRODUCCIÓN

En algunas de las complicaciones mencionadas en el apartado 1.2 del presente trabajo, existen trabajos publicados que evalúan la asociación de biomarcadores sanguíneos con la ocurrencia de estas complicaciones. Así, en la fase aguda, niveles elevados del inhibidor endógeno del rt-PA PAI-1 indicarían resistencia a la recanalización inducida por rt-PA en un estudio, aunque estos resultados no pudieron ser posteriormente replicados [Ribo M, 2004; Martí-Fàbregas J, 2005]. Por otra parte, niveles elevados de Metaloproteasa de Matriz 9 (MMP-9), fibronectina celular o proteína de adhesión vascular 1 (VAP-1) [Montaner J, 2003; Castellanos M, 2004; Hernández-Guillamón M, 2010], podrían indicar un alto riesgo de sufrir una transformación hemorrágica. La misma fibronectina celular, además de la proteína glial S100B, han sido descritos como predictores del desarrollo de edema maligno en el infarto de la arteria cerebral media [Serena J, 2005; Foerch C, 2004]. Si estos resultados fuesen confirmados en cohortes mayores, o mejorados mediante la incorporación de nuevos biomarcadores, podría desarrollarse una estrategia personalizada, teniendo en cuenta el potencial beneficio de la recanalización y el riesgo de complicaciones como una posible transformación hemorrágica o edema cerebral, a la hora de indicar las terapias de reperfusión.

En la fase subaguda, diversos marcadores inflamatorios o inmunológicos han demostrado elevarse de forma precoz en aquellos pacientes con infecciones secundarias al ictus, como sería el caso de la IL-6, procalcitonina, copeptina, IL-13 o interferón gamma [Wartenberg KE, 2011; Furi F, 2012; Salat D, 2013]. El uso de estos biomarcadores podría ser de interés para identificar, de forma objetiva, a los pacientes con mayor riesgo de sufrir una infección, para instaurar medidas preventivas e, incluso, para seleccionar a estos pacientes para nuevos ensayos clínicos de antibioterapia profiláctica.

A pesar de ser menos conocidas y menos estudiadas las complicaciones del ictus en este periodo, también en la fase crónica se han establecido algunas asociaciones entre biomarcadores plasmáticos y el desarrollo de complicaciones, como es el caso de la leptina y la proteína C reactiva (CRP) para el desarrollo de depresión [Jiménez I, 2009; McKechnie F, 2012], o la enzima beta-secretasa 1 (BACE1) para el deterioro cognitivo post-ictus [Quian L, 2012]. La siguiente tabla muestra un resumen de los biomarcadores sanguíneos descritos para las complicaciones del ictus en las diversas fases de la historia natural del mismo.

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 5. Principales biomarcadores descritos en asociación con las complicaciones neurológicas y sistémicas del ictus. Adaptado de Bustamante A, et al. Eur J Intern Med 2015**

	BIOMARCADORES SANGUÍNEOS
Resistencia a recanalización	S100B [Foerch C, 2003] PAI1 [Ribó M, 2004]
Transformación hemorrágica	Alfa-2-Antiplasmina [Martí-Fàbregas J, 2005] MMP9 [Montaner J, 2003] S100B [Foerch C, 2007] Fibronectina celular [Castellanos M, 2004] Ferritin [Millán M, 2007; Choi KH, 2012] VAP-1 [Hernández-Guillamón M, 2010] FMPPs [Llomart V, 2014] NURR1 [Merino-Zamorano C, 2015]
Edema cerebral	S100B [Foerch C, 2004] Fibronectina celular [Serena J, 2005] Endotelina 1 [Moldes O, 2008] Pro-MMP10 [Rodríguez JA, 2013]
Infecciones nosocomiales	mHLA-DR [Harms H, 2008; Wartenberg KE, 2011; Hug A, 2011] IL6 [Wartenberg KE, 2011; Zhang X, 2012] PCT [Hug A, 2011; Fluri F, 2012] CRP [Wartenberg KE, 2011; Fluri F, 2012; Zhang X, 2012] Copeptina [Fluri F, 2012] IL13, IFNG [Salat D, 2013]
Depresión y fatiga	Cortisol [Reding M, 1985] Leptina [Jiménez I, 2009] CRP [McKechnie F, 2010; Zhan Y, 2014] IL18 [Yang L, 2010] BDNF [Yang L, 2011]
Deterioro cognitivo	Homocisteína, ácido metil-malónico [Pascoe MC, 2012] NSE [Li Y, 1995] CRP [Rothemburg LS, 2012] Indolamina 2,3-dioxigenasa [Gold AB, 2011] S-RAGE, BACE1 [Quian L, 2012] ESR [Kliper E, 2013]

PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1; MMP-9: metaloproteínasa de matriz 9; VAP-1: proteína de adhesión vascular 1; FMPPs: productos fluorescentes de peroxidación molecular; NURR1: proteína relacionada con el receptor nuclear 1; pro-MMP-10: pro-metaloproteínasa de matriz 10; mHLA-DR: antígeno leucocitario humano DR monocitario; IL-6: interleucina 6; PCT: procalcitonina; CRP: proteína C-reactiva; IL13: interleucina 13; IFNG: interferón gamma; BDNF: factor neurotrófico derivado cerebral; IL18: interleucina 18; NSE: enolasa neuro-específica; S-RAGE: receptor soluble para productos finales de glicosilación avanzada; BACE1: enzima beta-secretasa 1; VSG: velocidad de sedimentación globular.

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

## **2. OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

OBJETIVO 1. Determinar qué factores tienen mayor impacto sobre el pronóstico del ictus en nuestro medio, con especial atención a las complicaciones del ictus

OBJETIVO 2. Determinar en qué indicaciones es más demandado el uso de biomarcadores plasmáticos para el manejo del ictus

OBJETIVO 3. Investigar para biomarcadores clásicos su asociación al pronóstico del ictus y las complicaciones del mismo a través de revisiones sistemáticas de la literatura

OBJETIVO 4. Testar el valor predictivo adicional de biomarcadores candidatos sobre las indicaciones identificadas en los objetivos 1 y 2

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

### **3. MÉTODOS Y RESULTADOS. COPIA DE LAS PUBLICACIONES**



## MÉTODOS Y RESULTADOS. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN

***3.1. Neuroendocrine hormones as prognostic biomarkers in the setting of acute stroke: overcoming the major hurdles. Bustamante A, et al. Expert Rev Neurother. 2014; 14: 1391-1403***

EXPERT  
REVIEWS

# Neuroendocrine hormones as prognostic biomarkers in the setting of acute stroke: overcoming the major hurdles

*Expert Rev. Neurother.* Early online, 1–13 (2014)

Alejandro Bustamante<sup>1</sup>,  
Teresa  
Garcia-Berrococo<sup>1</sup>,  
Victor Llombart<sup>1</sup>,  
Alba Simats<sup>1</sup>,  
Dolors Giral<sup>1</sup> and  
Joan Montaner<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Neurovascular Research Laboratory,  
Vall d'Hebron Institut of Research,  
Hospital Universitari Vall d'Hebron,  
Universitat Autònoma de Barcelona,  
Pg. Vall d'Hebron, 119-129,  
08035 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Neurology Department, Neurovascular  
Unit, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona,  
Spain

\*Author for correspondence:

Tel.: +34 934 894 073

Fax: +34 934 894 015

31862jmv@comb.cat

Stroke represents one of the major causes of disability and mortality worldwide and prediction of outcome represents a challenge for both clinicians and researchers. In the past years, many blood markers have been associated with stroke outcome but despite this evidence, no biomarker is routinely used in stroke management. In this review, we focus on markers of the neuroendocrine system, which represent potential candidates to be implemented in clinical practice. Moreover, we present a systematic review and literature-based meta-analysis for copeptin, a new biomarker of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis that has shown additional predictive value over clinical information in a large prospective study. The meta-analysis of the included 7 studies, with more than 2000 patients, reinforced its association with poor outcome (pooled odds ratio: 2.474 [1.678–3.268]) and mortality (pooled OR: 2.569 [1.642–3.495]). We further review the current situation of the topic and next steps to implement these tools by clinicians.

**KEYWORDS:** biomarker • copeptin • meta-analysis • neuroendocrine marker • outcome • prognosis • stroke  
• systematic review

Stroke represents one of the major causes of disability and mortality worldwide. Recent data reported an age-adjusted incidence of 114.7/100,000 men and 74.9/100,000 women in Europe [1]. Moreover, stroke represents the second most common cause of death, accounting for almost 1.1 million deaths in Europe each year, being 15% of all deaths in women and 10% of deaths in men due to stroke [2].

Besides mortality, about half of stroke survivors are left with some degree of physical or cognitive impairment and a 20% of them will require institutional care. This situation ranks stroke to the third leading cause of disability worldwide, which entails a 1.6 and 2.5% of total disability-adjusted life years for ischemic and hemorrhagic stroke, respectively [3]. Prediction of outcome after stroke could be applied, apart from informing patients and relatives, to improve decision-making processes giving an overview about the risk or benefits of some clinical interventions such as the admission to stroke units, or potentially harmful therapies, like thrombolysis or hemicraniectomy. Also, in

patients with transient ischemic attacks or minor stroke, the use of blood biomarkers could predict the risk of recurrent vascular events. In those patients, a closer monitoring and an early initiation of secondary prevention strategies might result in improved outcomes. The predictive role of clinical variables in the acute stroke setting to elucidate the prognosis of patients have been explored by several authors, emphasizing the interest in this topic in clinical practice [4,5]. In the past years, several predictive models for disability and mortality in stroke patients have been generated, validated and evaluated in terms of accuracy, with values around 80% in most models [6–9]. Although many of them agree on common predictor variables such as age and severity of stroke, they include other variables that are not easily accessible or hard to be interpreted, like radiological data. The use of simplified models including just age and stroke severity may lead to insufficient accuracy rates, underestimating poor prognosis [10]. Also, the different cutoff limits that these models use to categorize numerical

variables may not be useful depending in the scenario. For example, it has been reported that the prediction of outcome in patients with milder strokes by these scales was less reliable [5]. Given these limitations, such types of prognostic models are not currently used in routine clinical practice.

### **Blood markers for prediction of stroke prognosis. Can they improve the accuracy of clinical information?**

Although several categories of biomarkers could be used in stroke practice, such as imaging, neurophysiologic or histological biomarkers; and molecular markers could be obtained from other biological fluids such as urine or saliva, we will refer to blood biomarkers hereinafter and, more specifically, the main focus of this review will be the use of blood biomarkers for outcome prediction in ischemic stroke.

The most studied surrogate biomarkers in stroke are those related with its pathophysiology, although in the recent years interest has increased for high-throughput techniques based on a large screening process, avoiding selection bias and generating wide lists of molecules to be evaluated. In the biomarker field, and taking into account that proteins are the most widely used biomarkers, a whole proteome approach could be addressed with antibody libraries or mass spectrometry-based techniques covering a wide number of proteins [11]. However, such type of approach should be carefully interpreted as not wide consensus exists about statistical corrections and signification thresholds to avoid false-positive results [12,13].

While blood biomarkers have been used for many years in other vascular conditions such as troponins for myocardial infarction diagnosis and monitoring, glycosylated hemoglobin for diabetes monitoring or low-density lipoprotein cholesterol level for starting lipid-lowering therapies, no biomarker is routinely used in stroke management either for diagnostic, prognostic or risk-stratification purposes. In the field of stroke outcome prediction, besides stroke severity evaluation or monitoring, biomarker measurement seems to be an objective way to add information to clinical data and thus gaining accuracy in the prediction of stroke prognosis [14–16]. Blood circulating proteins involving different pathophysiological pathways altered in the stroke setting such as inflammation and immune system response [17,18], apoptosis [19], coagulation and fibrinolysis [20], tissue remodeling [21] or heart damage [22] have been repeatedly associated with stroke outcome. However, most of these studies were based in small populations and they assessed, at most, whether the surrogate biomarker(s) discloses or not an independent association with outcome via logistic regression or how much accuracy could be achieved when the biomarker is added to clinical information using the C-statistic (area under receptor operating characteristics curves). Moreover, the way to report the association of biomarkers with different outcomes differs between studies. While some authors calculates the best cutoff point for the prediction in their cohort, which is not free of bias [14], other authors reported these association in a continuous way, then representing the odds ratio (OR) for onefold increase or 10-fold increase when logarithmic transformation is

used. Nowadays, excluding discovery studies, the approach of replication of cutoff points of the literature or from pilot studies should be the rule [23].

However, the OR or the C-statistic seems to not adequately represent whether a biomarker adds or not predictive value over clinical models, so application of statistical tools contributing with additional information becomes necessary. One way to quantify the difference between predictive probabilities for events and no-events (poor or good outcome in the case of stroke prognosis analysis) when biomarkers are added to clinical variables is the Integrated Discrimination Improvement (IDI) index, which provides a numerical value to the difference between the predictive probabilities from the models with and without biomarkers and also shows whether it improves the discrimination of events (sensitivity) or no-events (specificity) [24]. It could be represented as bar graphs, being easily interpretable. Other statistical tool that could aid in the assessment of the added predictive value of biomarkers is the net reclassification improvement (NRI) index, which evaluates the net number of subjects (or patients) that are correctly reclassified among different groups of risk, when biomarkers are added to the model. As the IDI, the NRI could show the reclassification separately for events and no-events [24]. It could be assessed in two different ways, as a continuous variable where the increment of probability implicates a change of risk category, or by pre-specified risk categories, observing how many individuals change from one group to others. As the use of the continuous NRI could overestimate the rate of reclassification, the use of the categorical NRI with a maximum of three groups of risk (low, intermediate, high) including clinically relevant thresholds for the evaluated end point is currently recommended [25].

In stroke prognostic studies, thresholds of <10, 10–90 and >90% have repeatedly been used [26,27]. However, it remains controversial what are the most appropriate cutoff points for these thresholds, and it might depend on the indication that we would do eventually in clinical practice with the result of our predictive models. For instance, it seems reasonable to establish more strict cutoff points for a potentially harmful indication (such as discharge a patient with a low chance to experiment a poor outcome) than for less dangerous indications such as giving antibiotics to patients who are suspected to develop an infection. In this sense, wider thresholds (<25, 25–75 and >75%) for a predictive model for stroke-associated infections have been used [28].

### **Neuroendocrine hormones & stroke outcome**

Among the surrogate biomarkers to be used in brain ischemia, neuroendocrine molecules are of particular interest as biomarker candidates. In response to the stress that cerebral ischemia triggers, three main pathways get activated: the sympathetic nervous system (SNS), whose responses are mediated especially by catecholamines and which stimulate the release of natriuretic peptides (NPs); the parasympathetic nervous system (PSNS), which exerts its anti-inflammatory effects through the activation of cholinergic receptors and the

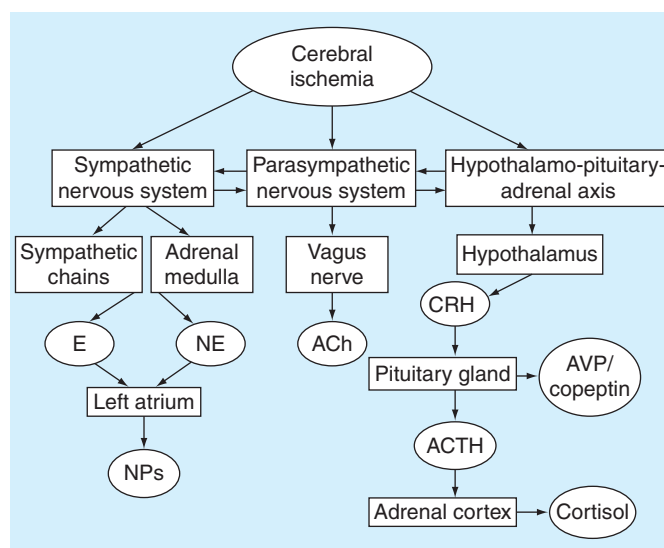
hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis, whose activation triggers the production of cortisol by the adrenal cortex (FIGURE 1). Measurable molecules related to the activity of these axes have been associated with stroke outcome (TABLE 1).

### Hormones of the SNS

Catecholamines (norepinephrine, epinephrine, metanephrine and dopamine), the neurotransmitters of the SNS, are produced in neurons of the locus coeruleus in response to brain ischemia, especially when the insula is affected [29]. In the acute stroke setting, increased levels of norepinephrine have been associated with poor long-term outcome [30,31] or post-stroke infections [32–34]. However, analytical problems such as the low specificity of some assay methods as well as the wide number of physiological determinants of their plasmatic concentrations limit its use [35].

NPs are vasoactive hormones whose release is stimulated, among others, by the SNS and who exert natriuretic, diuretic and vasodilator activities. Both A- and B-type natriuretic peptides (ANP and BNP) have been studied in stroke patients, with promising results in prognosis but also in etiologic diagnosis, where they have been related with cardioembolic origin [36–38], even BNP being proposed as a surrogate diagnostic tool to identify cardioembolic stroke etiology in patients with an initially negative work-up [39,40].

In patients with ischemic stroke, brain expression of ANP was described as being stimulated in the peri-infarct area compared with the infarct core; and with other causes of acute brain damage such as spontaneous intracerebral hemorrhages and brain trauma [41]. Based on these results, it has been hypothesized that ANP may be involved in the regulation of cerebral blood flow in the infarcted area. To our knowledge, two different studies have assessed the relationship between ANP and ischemic stroke outcome. In the first one, both ANP and BNP predicted mortality after stroke and acute myocardial infarction after adjustment by several factors related to vascular death such as age, diabetes, coronary artery disease and medication [42]. A limited sample size (51 stroke and 51 acute myocardial infarction patients) and a short statistical assessment (no further analysis after adjustment by the above-mentioned factors) represent the main concerns of this study. Moreover, it has been proposed that the mid-regional fragment of proANP (MR-proANP) could be a more stable molecule and therefore, a most reliable surrogate marker for cardiovascular diseases [43]. Its role as biomarker has been evaluated for diagnostic and prognostic indications in patients with heart failure [44,45], and recently in acute ischemic stroke, where MR-proANP has demonstrated to be good predictor of poor outcome and death, even after adjustment by stroke severity, in a sample size of 359 patients [46]. These results, although promising, will require further evaluation in larger, independent cohorts and tighter adjustments with reclassification and discrimination statistical tools. More recently, an exploratory study has described increased levels of MR-proANP as independently associated with poor functional outcome and mortality in patients with



**Figure 1. Cerebral ischemia triggers the activation of the neuroendocrine system in three different pathways, whose activity could be measured through plasma biomarkers.**

The figure represents the main organs (charts) and biomarkers (circles) implicated in this response and their interaction.

AVP: Vasopressin; ACh: Acetylcholine; ACTH: Adrenocorticotropic hormone; CRH: Corticotropin-releasing hormone; E: Epinephrine; NE: Norepinephrine; NPs: Natriuretic peptides.

hemorrhagic stroke, although its limited sample size (24 patients with subarachnoid hemorrhage and 22 with intracerebral hemorrhage) does not allow reaching a strong conclusion [47].

Regarding BNP, it has been described, together with the inactive N-terminal fragment of proBNP (NT-proBNP), as associated with unfavorable clinical outcome and mortality in stroke patients [22,42,48–56]. Moreover, regarding specific causes of worsening, higher BNP level has been associated with a lower chance of recanalization after thrombolysis [57]. However, the presence of some negative studies [58] and the fact that two studies [26,59] showed that, although BNP disclosed a statistically significant association with mortality and outcome, its addition to previously validated clinical information adds no prognostic information, questioned its predictive value. A comprehensive meta-analysis and individual participant data (IPD) meta-analysis on the association of BNP and all-cause mortality after stroke has been recently published [23]. In a first step, the meta-analysis included 16 studies and revealed that BNP levels were higher in those patients who died rather than survivors (weighted mean difference 255.78 pg/ml; 95% CI: 105.10–406.47;  $p = 0.001$ ). However, the loss of this association when publication bias was considered, the moderate quality of the included studies (median 7 over 15 points) and a high heterogeneity among studies were the main concerns. In the IPD analysis from 10 of these studies, including 2258 patients, the additional predictive value of BNP in the whole cohort could be assessed separately for BNP and NT-proBNP. Even when both BNP and NT-proBNP were independently associated with mortality after adjustment by age, gender and stroke

**Table 1. Overview of the studies addressing the predictive value of neuroendocrine hormones (excluding copeptin, which is further reviewed) in stroke.**

	Sample size and patient's type	Neurological outcome	Functional outcome	Mortality	Specific complications	Ref.
Catecholamines (NE, E)	n = 65 (56 IS, 9 SAH)	-	Associated	Associated	-	[30] (E & NE)
	n = 112, IS	-	Independent predictor	Independent predictor	-	[31] (NE)
	n = 75, IS	-	-	Independent predictor	Infection (associated)	[32] (NE)
	n = 45, IS	-	Not associated	-	Infection (associated)	[33] (E)
	n = 66, IS	-	-	-	Infection (associated)	[34] (NE)
B-type natriuretic peptides (BNP, NT-proBNP)	n = 51, IS	-	-	Independent predictor	-	[42] (BNP)
	n = 174, IS	-	Associated, not independent predictor	-	-	[48] (NT-proBNP)
	n = 250, IS	-	-	Associated	-	[49] (NT-proBNP)
	n = 114 (104 IS & 10 ICH)	-	Associated	Independent predictor	-	[50] (NT-proBNP)
	n = 72 (39 IS, 22 SAH, 11 ICH)	-	-	Associated	Heart Failure (Not Independent Predictor)	[51] (NT-proBNP)
	n = 41 (IS)	-	Not associated	Not associated	Brain edema (not associated)	[58] (BNP)
	n = 335, IS	-	-	Independent predictor	-	[22] (BNP)
	n = 125 (IS & ICH)	-	-	Independent predictor	-	[52] (NT-proBNP)
	n = 79 (IS)	-	-	-	Absence of recanalization (associated)	[57] (BNP)
	n = 221 (IS)	-	-	Independent predictor	-	[53] (BNP)
	n = 270 (IS)	-	Independent predictor, not additional value	-	-	[26] (NT-proBNP)
n = 569 (IS)	-	Independent predictor	Independent predictor	-	[54] (BNP)	
n = 106 (IS)	-	Independent predictor	Independent predictor	-	[55] (NT-proBNP)	

We considered the markers as 'not associated', if there were no differences on the marker between outcome groups; 'associated', if differences just appear in univariate analysis; 'independent predictor', if the differences remained after adjustment by significant outcome predictors and 'additional predictive value', if the marker showed to improve the predictive value of the clinical variables.  
 E: Epinephrine; ICH: Intracerebral hemorrhage; IS: Ischemic stroke; MR-proANP: Mid-regional fragment of proANP; NE: Norepinephrine; NT-proBNP: N-terminal fragment of proBNP; SAH: Subarachnoid hemorrhage.

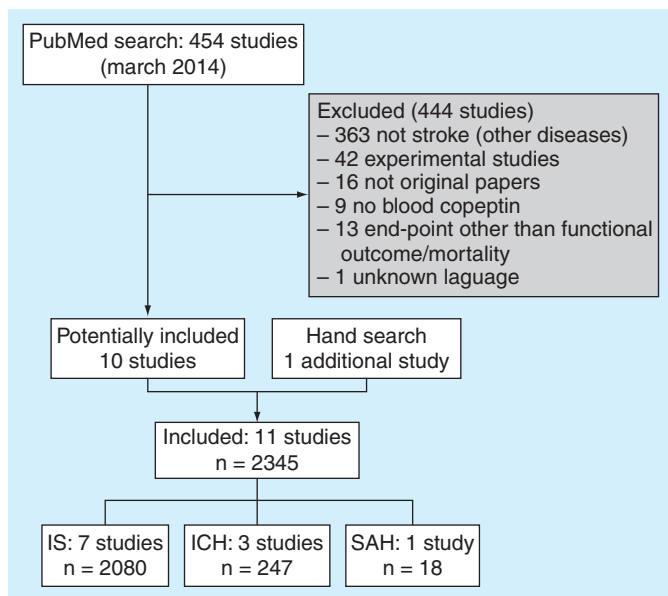
**Table 1. Overview of the studies addressing the predictive value of neuroendocrine hormones (excluding copeptin, which is further reviewed) in stroke (cont.).**

	Sample size and patient's type	Neurological outcome	Functional outcome	Mortality	Specific complications	Ref.
	n = 122 (IS)	–	–	Independent predictor	–	[56] (NT-proBNP)
	n = 896 (IS)	Independent predictor, not additional value	–	Independent predictor, not additional value	–	[59] (BNP)
	n = 270 (IS)	–	Independent predictor, not additional value	–	–	[27] (NT-proBNP)
A-type natriuretic peptides (ANP, MR-proANP)	n = 51 (IS)	–	–	Independent predictor	–	[42] (ANP)
	n = 362 (IS)	–	Additional predictive value	Additional predictive value	–	[46] (MR-proANP)
	n = 46, ICH	–	Associated	Associated	–	[47] (MR-proANP)
Acetylcholine esterase	n = 264 (IS)	–	–	Associated	–	[67]
Cortisol	n = 65, 56 IS, 9 SAH	–	Associated	Associated	–	[30]
	n = 75 (IS)	–	Not associated	–	Depression (associated)	[77]
	n = 28, 17 IS, 11 ICH	–	–	Associated	–	[70]
	n = 101	–	Associated	Associated	–	[71]
	n = 23 (IS)	–	Not associated	Not associated	Acute confusional state (not associated)	[78]
	n = 70 (IS)	–	Associated	–	–	[72]
	n = 22 (IS)	–	Not associated	Not associated	–	[76]
	n = 172 (IS)	–	Not associated	Independent predictor	–	[73]
	n = 51 (IS)	–	–	Independent predictor	–	[74]
	n = 66 (IS)	–	–	–	Infection (not associated)	[34]
	n = 45 (IS)	–	Not associated	–	Infection (associated)	[33]
	n = 281 (IS)	–	Independent predictor	Independent predictor	–	[75]

We considered the markers as 'not associated', if there were no differences on the marker between outcome groups; 'associated', if differences just appear in univariate analysis; 'independent predictor', if the differences remained after adjustment by significant outcome predictors and 'additional predictive value', if the marker showed to improve the predictive value of the clinical variables.

E: Epinephrine; ICH: Intracerebral hemorrhage; IS: Ischemic stroke; MR-proANP: Mid-regional fragment of proANP; NE: Norepinephrine; NT-proBNP: N-terminal fragment of proBNP; SAH: Subarachnoid hemorrhage.





**Figure 2.** Flow chart representing the search results and the screening process for the systematic review on copeptin and stroke outcome.

ICH: Intracerebral hemorrhage; IS: Ischemic stroke; SAH: Subarachnoid hemorrhage.

severity, just NT-proBNP showed a slight added value to clinical variables. The authors concluded that NPs do not have enough predictive value to be translated into clinical practice, at least by itself, although the incorporation of NT-proBNP in a panel with other molecules could be of interest.

Despite the absence of prospective, well-designed, multicenter studies with enough sample size to test the association and predictive value of blood biomarkers in stroke outcome prediction, such as type of approach, starting with throughout systematic reviews, then performing literature-based meta-analysis and finally analyzing the predictive value in the whole cohort through IPD analysis after adjusting by potential confounders could be an important step before clinical use [60]. According to the 'classification of evidence for diagnostic and for therapeutic measures', such type of studies may confer a class II level of evidence for a diagnostic tool [61]. Moreover and beyond the main conclusions of the article, the aforementioned meta-analysis identified several issues affecting the research on BNP, which might also affect other surrogate markers.

First, the presence of publication bias represents a major concern in the biomarker field. In the case of NPs, the association between them and post-stroke mortality was lost when publication bias was considered. However, publication of negative studies is harder than positive ones, having generally less impact in the literature. The absence of publication of negative results could lead to an overestimation of the biomarker effect [62], while its publication may save resources for other researchers and may contribute to a more realistic point of view.

Second, the included studies just disclosed a moderate quality using a 15-point quality score [23] based on the Quality

Assessment of Diagnostic Accuracy Studies and the Quality Questionnaires [14,63]. The implementation of such type of quality tests together with the specified guidelines, even asked by reviewers and/or editors during the peer-review processes, could be of interest to generate well-designed studies, thus minimizing the risk of bias and facilitating the translation of laboratory results into clinical settings.

Third, the results of the meta-analysis claimed again for the need to perform additional discrimination or reclassification tests after assessment of independent association between the surrogate biomarker and the clinical end point. In this case, despite the independent association of NPs with statistical significance and good OR values (SUPPLEMENTARY DATA [supplementary material can be found online at [www.informahealthcare.com/suppl/14737175.2014.977867](http://www.informahealthcare.com/suppl/14737175.2014.977867)]), it was hard to translate into clinical decision-making processes, as the values of the IDI and NRI were insufficient and just slightly significant for NT-proBNP.

### Hormones of the PSNS

In response to brain ischemia, PSNS activation through acetylcholine secretion by the vagus nerve could balance the overactivation of the SNS [64,65]. Acetylcholine esterase (AChE) activity has been found higher in cerebrospinal fluid of acute stroke patients compared with healthy controls [66]. Recently, lower serum AChE activities have been found in acute stroke patients compared with controls, and those patients who died after a 12-month follow-up period were found to have lower AChE activities than survivors in the same study [67]. Whether the role of AChE as a marker of the PSNS activity could predict specific post-stroke complications is under investigation.

### Hormones of the HPA axis

Besides the SNS and the PSNS, the other important pathway of the neuroendocrine system that has been explored regarding a potential use in stroke outcome prediction is the HPA axis, whose activity is initiated by the corticotropin-releasing hormone and ends with the release of cortisol from the adrenal cortex. Cortisol levels have been shown, in several acute conditions, to correlate with the severity of the underlying illness [68,69]. In acute ischemic stroke patients, elevated cortisol has been associated with greater stroke severity, larger infarct volume and/or unfavorable outcome [30,70–75], while some studies did not find any association [76]. Regarding its association with comorbidity in stroke patients, cortisol levels have been found raised in patients with depression [77], acute confusional state [78] or infections [32,34]. A systematic review on the influence of cortisol levels in stroke outcome has been recently carried out [79]. Although meta-analysis was not possible due to high variability in timing and method of cortisol measurement, the authors identified 11 studies including 942 patients, which reported the association between cortisol levels and functional outcome. Eight of these studies found that higher cortisol levels were associated with poor

**Table 2. Articles identified in the systematic review of copeptin and their main characteristics.**

Study (year)	Blood material	Type of patients	Time of blood collection	Sample size	Poor outcome rate (%)	Time of disability assessment	AdjOR for copeptin (disability)
Katan <i>et al.</i> (2009)	Plasma	IS	<72 h	359	42	3 months	2.53 (1.26–5.07)
Zweifel <i>et al.</i> (2010)	Plasma	ICH	<72 h	40	45	3 months	3.10 <sup>†</sup> (1.02–9.39)
Urwyler <i>et al.</i> (2010)	Plasma	IS	<72 h	341	42.8	1 year	4.0 (1.90–8.20)
Tu <i>et al.</i> (2011)	Serum	IS	–	38	55	3 months	3.12 (1.54–6.46)
Zhang <i>et al.</i> (2012)	Plasma	ICH	<6 h	89	62.9	1 year	1.19 (1.10–1.32)
Fung <i>et al.</i> (2013)	Plasma	SAH	–	18	27.8	6 months	–
Dong <i>et al.</i> (2013)	Plasma	IS	<48 h	125	32.8	3 months	3.12 (1.54–6.46)
De Marchis <i>et al.</i> (2013)	Plasma	IS	<24 h	783	38.3	3 months	2.17 (1.46–3.22)
Zhang <i>et al.</i> (2013)	Plasma	IS	<24 h	245	40.4	1 year	3.88 (1.94–7.77)
Tu <i>et al.</i> (2013)	Plasma	IS	–	189	38.1	3 months	2.34 (1.23–4.48)
Yu <i>et al.</i> (2014)	Plasma	ICH	<6 h	118	57.6	6 months	–

<sup>†</sup>Denotes unadjusted odds ratio.  
AdjOR: Adjusted odds ratio; ICH: Intracerebral hemorrhage; IS: Ischemic stroke; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; SAH: Subarachnoid hemorrhage.

outcome, whereas three studies did not. However, just five studies adjusted the predictive models for stroke severity. Regarding mortality, 10 studies (n = 895) examined its relation to cortisol levels and all of them found that elevated cortisol was associated with increased mortality rates, although this was not statistically significant in two of the studies. The authors conclude that elevated cortisol after stroke is associated with greater dependency, morbidity and mortality. However, there is currently insufficient evidence to conclude that these relationships are independent of stroke severity.

Together with corticotropin-releasing hormone, vasopressin (AVP) is the main secretagogue of the HPA axis to produce adrenocorticotrophic hormone and therefore, cortisol. Although small studies found increased AVP levels in patients with ischemic stroke [80], correlating with stroke severity [81], the obtained results for this biomarker should be carefully interpreted due to the fact that AVP is unstable (half-life 5–15 min) and largely attached to platelets [82]. AVP derives from a larger precursor peptide (pre-provasopressin) along with two other peptides, neurophysin II and copeptin. The later is released in an equimolar ratio to AVP, is the most stable in the circulation and the easiest to determine which may make this peptide an interesting alternative to determinations of the highly unstable AVP [83,84].

Several studies have assessed the prognostic value of copeptin in acute stroke, showing independent associations with poor outcome in ischemic stroke [85,86], basal ganglia intracerebral hemorrhage [87] and subarachnoid hemorrhage [88]. In ischemic

stroke, given the promising preliminary results, a large multicenter, prospective study has been recently published, the Copeptin for Risk Stratification in Acute Stroke Patients (CoRisk) study, which included 783 acute stroke patients with copeptin measurement in the first 24 h [89]. Higher copeptin levels independently predicted 3-month unfavorable outcome, 3-month mortality and in-hospital complications (symptomatic intracerebral hemorrhage, edema, pneumonia, seizures or 10-day mortality). Moreover, the combination of copeptin with validated clinical variables, both the NIH Stroke Scale (NIHSS) and age, led to a NRI of 11.8% for poor functional outcome and of 37.2% for mortality. Despite these promising results, the study has two major concerns to be translated into clinical practice. First, the thresholds that the authors chose for the NRI index, which included four risk categories: 0–5, 5–10, 10–15 and >15%, make it difficult a practical interpretation of the results. As has been abovementioned, no more than three categories are currently recommended [26] and it seems difficult that a risk category of >15% could lead to a clinical decision. Second, the fact that the study was underpowered to assess each complication separately together with the fact that the exact time of onset of the complications was unknown, make it difficult to establish an specific time-point for copeptin measurement that enables a decision-making process to prevent or treat as soon as possible a particular complication. Despite these limitations, the present study represents a prospective effort, which replicates previous results in a large cohort and assesses the additional predictive value of the biomarker over



Mortality rate (%)	Time of mortality assessment	AdjOR for copeptin (mortality)	Age	Gender	Baseline NIHSS	Quality score	Ref.
12	3 months	4.23 (1.61–11.15)	75 (63–83)	59%	5 (2–10)	12	[85]
15	1 month	19.48 <sup>†</sup> (2.10–180.64)	71 (64–78)	55%	–	11	[92]
19.3	1 year	2.70 (1.20–5.80)	75 (65–83)	60%	5 (2–10)	11	[94]
18.8	3 months	–	62 (55–84)	61.00	7 (3–12)	8	[95]
42.7	1 year	1.14 (1.06–1.35)	64.5 ± 10.9	60.7%	21.0 ± 6.6	9	[87]
22.2	6 months	–	57 (48–67)	33.3%	–	10	[88]
14.4	3 months	3.16 (0.92–6.15)	69 (61–85)	52%	7 (3–12)	11	[97]
15.1	3 months	2.40 (1.60–3.60)	71 (60–80)	61%	6 (3–13)	12	[89]
16.7	1 year	5.99 (2.55–14.07)	62 ± 11	58%	6 (3–12)	11	[96]
13.2	3 months	2.34 (1.23–4.48)	66 (58–75)	61%	7 (5–12)	13	[86]
31.3	6 months	–	64.1 ± 9.1	61%	15 (5–23)	7	[93]

the clinical information, which should be the rule for future validation studies.

### Copeptin as an outcome biomarker in stroke.

#### Systematic review & meta-analysis

As copeptin seems to be a surrogate candidate to predict stroke prognosis, being the first biomarker in showing additional predictive value over clinical information over clinical variables and one of the most promising to be translated into clinical practice, we performed a systematic review on copeptin association with post-stroke outcome. Our main aim was to comprehensively assess the association between copeptin and outcome through the literature and the evaluation of the quality of these studies. Secondary objectives were the search for publication bias, and to explore if the association of copeptin with post-stroke complications has been evaluated.

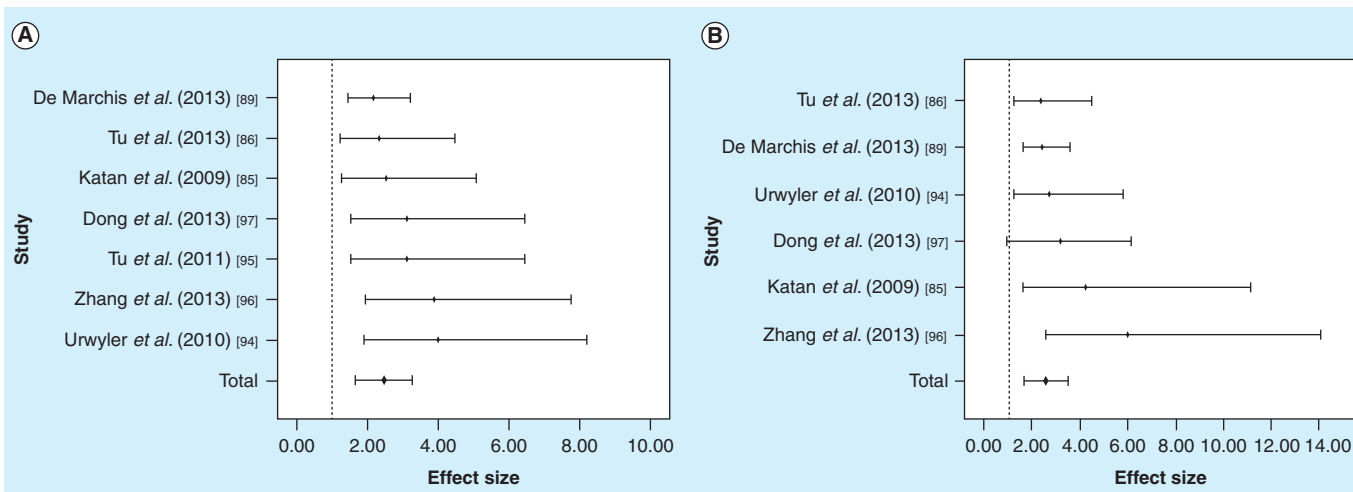
We searched PubMed up to March 2014, using generic terms for 'copeptin', 'neuroendocrine hormones' and 'stroke'. Lists of references of the included studies and review articles identified in the search were also screened. Two of the authors screened the titles and abstracts of every study identified in the first search and then three of the authors performed independently data extraction following a standardized template and qualification of the studies using the 15-point quality score aforementioned [23]. Inclusion criteria were inclusion of stroke patients, measurement of blood copeptin levels and outcome and/or mortality

assessment. Exclusion criteria were unknown language, experimental studies, reviews or abstracts, editorials or case reports and interventional studies or clinical trials.

Odd ratios for copeptin in outcome and mortality models were taken from each study. Heterogeneity was assessed by Cochrane Q statistic [90]. Effect size was calculated for outcome and mortality using a fixed or a random effect model according to the presence or absence of heterogeneity. Meta-regression was done to adjust the results by confounding factors at study level (age, gender, blood material used, time of blood withdrawal, time of outcome and death assessment, NIHSS at admission, each point of quality score and the total score punctuation) that may result in a modification of the effect. Publication bias was assessed using Duval and Tweedie non-parametric 'trim and fill' method [91]. All analyses were performed using SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and STATA 10.0 (StataCorp, College Station, TX, USA).

Our search revealed 454 studies of which 10 fulfilled inclusion criteria and were explored (FIGURE 2). Another study was identified in the hand-searching. From the selected articles, three studies recruited patients with intracerebral hemorrhage [87,92,93], one with subarachnoid hemorrhage [88] and the other seven articles included ischemic stroke patients [85,86,89,94–97].

Quality of the 11 articles was moderate to high (median 11), ranging from 7 to 13. The most frequently missing points were blinded determination of biomarkers (just reported in two studies), use of validated cutoff points (one study) and none of them did a previous calculation of the sample size (data not shown). There



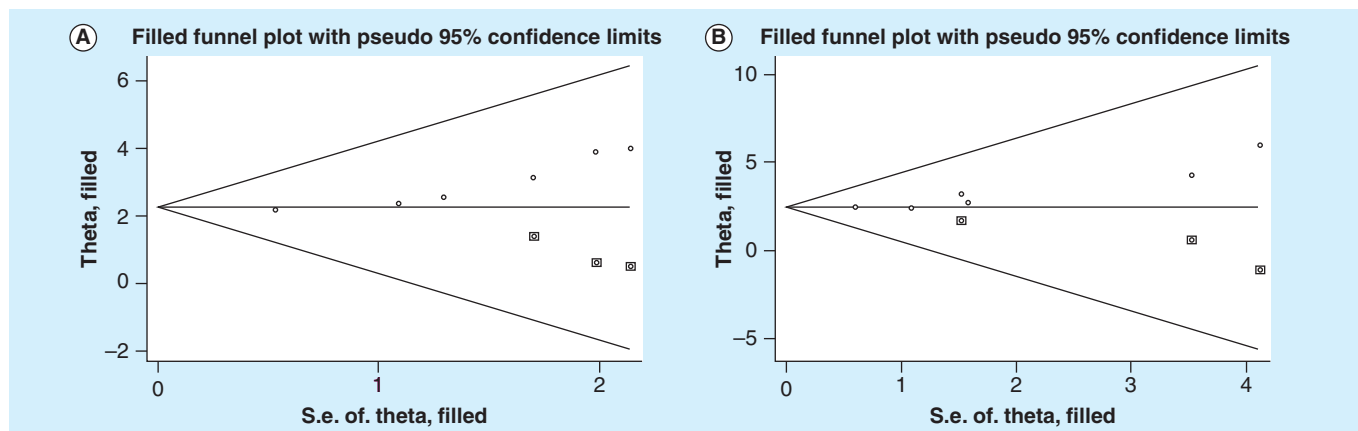
**Figure 3. Forest plot.** Horizontal lines represent adjusted odds ratios and 95% CIs of copeptin for functional outcome (A) and mortality (B) for each study and the pooled effect for all studies together.

were not a wide heterogeneity on study designs (TABLE 2); all of them collected blood samples in the first 72 h, assessed disability with the modified Rankin scale and used similar variables to adjust the effect of copeptin (most of them age and baseline NIHSS). Time for outcome assessment varied from 3 months to 1 year. Temporal profile of copeptin was not determined in any of the studies.

The seven studies including ischemic stroke patients were included in meta-analysis, including 2080 patients. All of them gave ORs for copeptin after adjustment by significant outcome predictors, although four of them reported ORs for log-transformed values [85,89,94,97], while values for increase per unit were given in the other three [86,95,96]. No study assessed OR after calculation of discriminating cutoff point. Heterogeneity of the studies was not significant ( $Q = 1.635$ ;  $p = 0.95$  for functional outcome and  $Q = 1.187$ ;  $p = 0.94$  for mortality), so a fixed model was used. As shown in FIGURE 3, meta-analysis of the seven studies including ischemic stroke patients revealed the association

of copeptin with poor functional outcome (pooled OR: 2.474; 95% CI: 1.678–3.268;  $p < 0.001$ ) and mortality (pooled OR: 2.569; 95% CI: 1.642–3.495;  $p < 0.001$ ). Meta-regression did not identify any relevant confounder between the potential confounders. Publication bias was present (FIGURE 4) for both functional outcome and mortality. The effect of copeptin in functional outcome and mortality decreased when publication bias was considered but it was still significant (pooled OR: 2.243; 95% CI: 1.514–2.971;  $p < 0.001$  for functional outcome and pooled OR: 2.418; 95% CI: 1.545–3.291;  $p < 0.001$  for mortality).

This meta-analysis presents some limitations. First, due to the study design, we were not able to test the additional predictive value over clinical information in our study-level meta-analysis. It could be tested by contacting the authors and analyzing data from individual patients in a whole cohort, which would allow the application of more meaningful statistical approaches, but such comprehensive approach is out of the aim



**Figure 4. Assessment of publication bias by funnel plots.** Horizontal line represents the global effect size for functional outcome (A) and mortality (B), and oblique lines picture 95% CIs. Circles are plotted as effect size and their standard error from published articles. Squares represent the studies in which the effect size was estimated.

of this study. Second, the fact that just ischemic stroke patients could be included into the meta-analysis makes difficult the generalization of the results to all stroke patients, but we think this step was necessary to avoid the heterogeneity that is present between stroke types.

Our results are in line with the previous literature of this biomarker and support its use in clinical practice, although several questions should be previously answered. The absence of a temporal profile is a major limitation before jumping into clinical practice. Future studies of this biomarker, in our opinion, should address this action in order to find the best moment for copeptin measurement. The other big issue that should be addressed is the use that physicians may give to this marker, because just one of these studies [89] reported association with post-stroke complications, information that might be used to improve patient's allocation but not for a real decision-making process. If the information concerning the biomarker could be linked to a biological process leading to a poor outcome, as a specific cause of worsening, it would represent a unique opportunity for outcome modification. Copeptin has been associated with the development of infections in one study [98], but this association has not been further explored and copeptin association with other causes of neurological worsening as hemorrhagic transformation increased intracranial pressure and edema, or cardiovascular complications has not been explored yet.

### Expert commentary

Neuroendocrine hormones represent candidate surrogate markers to be used in stroke clinical practice and the published literature suggests a better performance for recently discovered biomarkers such as MR-proANP or copeptin. However, two major critical issues should be addressed before its implementation. In one way, their additional predictive value over clinical information, which has been already done for copeptin [89], should be performed accurately. Otherwise, their blood levels should be linked not just with general measures of prognosis such as disability or death but with specific causes of worsening that complicates the course of stroke and leads to a poor

outcome. Given the difficulties for performing large, multicenter, prospective studies, meta-analysis and IPD analyses allow the generation of class II level of evidence for diagnostic measures and may be considered. As the last step before jumping to clinical implementation, semi-interventional trials linking the biomarker information with a specific intervention, such as the STRoke Adverse outcome is associated With NoSocomial Infections trial [99], which is evaluating the use of a biomarker-guided (ultrasensitive procalcitonin) strategy in the indication of preventive antibiotic therapy in patients with severe stroke, should be considered.

### Five-year view

Implementation of biomarkers in the clinical setting, even after several years of increasing research on the topic, represents a major issue. In the era of imaging, surrogate markers need to have top rates of sensitivity and specificity; nobody asked for a computer tomography in the past years. However, these difficulties are improving the quality of the research in the topic and, in the next years, large prospective multicenter studies may establish real indications to implement blood-based diagnostic tests in stroke patients. While no biomarker has demonstrated enough predictive value, combination of a panel of biomarkers in a point-of-care device might be a more realistic approach. Finally, new identified biomarkers could serve in the next year as therapeutic targets.

### Financial & competing interests disclosure

Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005) and is supported on stroke biomarkers research by FIS 11/0176. A Bustamante is supported by a Rio Hortega contract CM/00265 from the Instituto de Salud Carlos III and V Llombart is supported by a pre-doctoral fellowship from Vall d'Hebron Institut de Recerca. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Key issues

- Biomarkers of the neuroendocrine system represent surrogate tools in stroke clinical practice for outcome assessment. Although most of them have disclosed independent association with outcome, their added predictive value over clinical information should be addressed for both classical and new candidates.
- However, most of the literature in this topic is exploratory. Studies with large sample sizes are needed. While the preferable model is a large, multicenter study, meta-analyses or individual participant data approaches may be also useful in generating evidence.
- While the most studied marker of these system, B-type natriuretic peptides, seems not to be useful for outcome prediction in stroke patients, at least by itself, mid-regional fragment of proANP and copeptin have shown promising results in this field.
- A literature-based meta-analysis of copeptin in outcome prediction reinforces its association with stroke outcome, besides the existence of publication bias. Publication of negative results in the biomarker field should be considered and recommended for both researchers and editors.
- For the surrogate markers, it would be useful to clarify if the association with outcome is mediated with a specific worsening cause, which could facilitate translation into use in clinical practice. Evaluation in semi-interventional clinical studies about the impact of the biomarker use in clinical practice, in terms of outcome modification, should be the last step before clinical implementation.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

1. European Registers of Stroke (EROS) Investigators. Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, et al. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke* 2009;40(5):1557-63
2. Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network; Brussels: European Society of Cardiology; Sophia Antipolis: 2012
3. Murray JL, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380(9859):2197-223
4. Counsell C, Dennis M. Systematic review of prognostic models in patients with acute stroke. *Cerebrovasc Dis* 2001;12(3):159-70
- **Excellent review on the challenge of outcome prediction and the use of prognostic models in stroke patients.**
5. Teale EA, Forster A, Munyombwe T, Young JB. A systematic review of case-mix adjustment models for stroke. *Clin Rehabil* 2012;26(9):771-86
6. Ntaios G, Faouzi M, Ferrari J, et al. An integer-based score to predict functional outcome in acute ischemic stroke: the ASTRAL score. *Neurology* 2012;78(24):1916-22
7. Strbian D, Seiffge DJ, Breuer L, et al. Validation of the DRAGON score in 12 stroke centers in anterior and posterior circulation. *Stroke* 2013;44(10):2718-21
8. Saposnik G, Raptis S, Kapral MK, et al. on behalf of the investigators of the registry of the Canadian Stroke Network and the Stroke Outcomes Research Canada Working Group. The iScore predicts poor functional outcomes early after hospitalization for an acute ischemic stroke. *Stroke* 2011;42(12):3421-8
9. O'Donnell MJ, Fang J, D'Uva C, et al. for the investigators of the registry of the Canadian Stroke Network. The PLAN score. A bedside prediction rule for death and severe disability following acute ischemic stroke. *Arch Intern Med* 2012; 172(20):1548-56
10. Saposnik G, Guzik AK, Reeves M, et al. Stroke prognostication using age and NIH stroke scale: SPAN-100. *Neurology* 2013; 80(1):21-8
11. Martínez-Morillo E, García-Hernández P, Begcevic I, et al. Identification of novel biomarkers of brain damage in patients with hemorrhagic stroke by integrating bioinformatics and mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res* 2014;13(2): 969-81
12. Mellick GD, Silburn PA, Sutherland GT, Siebert GA. Exploiting the potential of molecular profiling in Parkinson's disease: current practice and future probabilities. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(8):1035-50
13. Abu-Asab MS, Chaouchi M, Alesci S, et al. Biomarkers in the age of omics: time for a systems biology approach. *OMICS* 2011; 15(3):105-12
14. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2009;40(5):e380-9
- **Excellent review of the literature on stroke prognostic biomarkers and guidelines for future studies.**
15. Katan M, Elkind MSV. Inflammatory and neuroendocrine biomarkers of prognosis after ischemic stroke. *Expert Rev Neurother* 2011;11(2):225-39
- **Excellent review on selected stroke biomarkers for outcome prediction and recommended methods for future studies.**
16. Hasan N, McColgan P, Bentley P, et al. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2012;74(2):230-40
17. Smith CJ, Emsley H, Gavin CM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol* 2004;4:2
18. Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, et al. Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke* 2006; 37(5):1205-10
19. Rosell A, Cuadrado E, Alvarez-Sabín J, et al. Caspase-3 is related to infarct growth after human ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2008;430(1):1-6
20. Yang XY, Gao S, Ding J, et al. Plasma D-dimer predicts short-term poor outcome after acute ischemic stroke. *PLoS One* 2014; 9(2):e89756
21. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001;32(8):1759-66
22. Shibazaki K, Kimura K, Okada Y, et al. Plasma brain natriuretic peptide as an independent predictor of in-hospital mortality after acute ischemic stroke. *Intern Med* 2009;48(18):1601-6
23. García-Berrococo T, Giralt D, Bustamante A, et al. B-type natriuretic peptides and mortality after stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 2013;81(23):1976-85
- **Well-conducted systematic review, meta-analysis and individual participant data analysis reflecting the current situation of the marker.**
24. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med* 2008; 27(2):157-72
- **Excellent and intuitive article on the use of new statistical tools for biomarker studies.**
25. Pickering JW, Endre ZH. New metrics for assessing diagnostic potential of candidate biomarkers. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7(8):1355-64
26. Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, et al. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke* 2012; 43(1):86-91
27. García-Berrococo T, Giralt D, Bustamante A, et al. Role of beta-defensin 2 and interleukin-4 receptor as stroke outcome biomarkers. *J Neurochem* 2014; 129(3):463-72
28. Salat D, Penalba A, García-Berrococo T, 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
29. Meyer S, Strittmatter M, Fischer C, et al. Lateralization in autonomic dysfunction in ischemic stroke involving the insular cortex. *Neuroreport* 2004;15(2):357-61
30. Feibel JH, Hardy PM, Campbell RG, et al. Prognostic value of the stress response following stroke. *JAMA* 1977;238(13): 1374-6
31. Sander D, Winbeck K, Klingelhöfer J, et al. Prognostic relevance of pathological sympathetic activation after acute thromboembolic stroke. *Neurology* 2001; 57(5):833-8
32. Urra X, Cervera A, Obach V, et al. Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke* 2009;40(4):1262-8



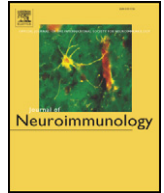
33. Chamorro A, Amaro S, Vargas M, et al. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2007; 252(1):29-35
34. Klehmet J, Harms H, Richter M, et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 2009;158(3):1184-93
35. Hjendahl P. Plasma catecholamines – analytical challenges and physiological limitations. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1993;7(2):307-53
36. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke* 2008;39(8):2280-7
37. Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Blanco M, et al. High serum levels of pro-brain natriuretic peptide (pro BNP) identify cardioembolic origin in undetermined stroke. *Dis Markers* 2009;26(4):189-95
38. Frontzek K, Fluri F, Siemerkus J, et al. Isolated insular strokes and plasma MR-proANP levels are associated with newly diagnosed atrial fibrillation: a pilot study. *PLoS One* 2014;9(3):e92421
39. Santamarina E, Penalba A, García-Berrocso T, et al. Biomarker level improves the diagnosis of embolic source in ischemic stroke of unknown origin. *J Neurol* 2012;259(12):2538-45
40. Rodríguez-Yáñez M, Arias-Rivas S, Santamaría-Cadauid M, et al. High pro-BNP levels predict the occurrence of atrial fibrillation after cryptogenic stroke. *Neurology* 2013;81(5):444-7
41. Nogami M, Shiga J, Takatsu A, et al. Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction. *Histochem J* 2001;33(2):87-90
42. Mäkikallio AM, Mäkikallio TH, Korpelainen JT, et al. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke* 2005; 36(5):1016-20
43. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem* 2004;50(1):234-6
44. Alehagen U, Dahlström U, Rehfeld JF, Goetze JP. Pro-A-type natriuretic peptide, proadrenomedullin, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide used in a multimarker strategy in primary health care in risk assessment of patients with symptoms of heart failure. *J Card Fail* 2013;19(1):31-9
45. Seronde MF, Gayat E, Logeart D, et al. Comparison of the diagnostic and prognostic values of B-type and atrial-type natriuretic peptides in acute heart failure. *Int J Cardiol* 2013;168(4):3404-11
46. Katan M, Fluri F, Schuetz P, et al. Midregional pro-atrial natriuretic peptide and outcome in patients with acute ischemic stroke. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(13): 1045-53
- **Well-designed and conducted prospective study on biomarkers for stroke outcome prediction.**
47. Fischer M, Katan M, Morgenthaler NG, et al. The prognostic value of midregional proatrial natriuretic peptide in patients with hemorrhagic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2014; 37(2):128-33
48. Etgen T, Baum H, Sander K, Sander D. Cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in acute ischemic stroke do not relate to clinical prognosis. *Stroke* 2005;36(2):270-5
49. Jensen JK, Mickley H, Bak S, et al. Serial measurements of N-terminal pro-brain natriuretic peptide after acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2006;22(5-6): 439-44
50. Sharma JC, Ananda K, Ross I, et al. N-terminal probrain natriuretic peptide levels predict short-term poststroke survival. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006;15(3):121-7
51. Koenig MA, Puttgen HA, Prabhakaran V, et al. B-type natriuretic peptide as a marker for heart failure in patients with acute stroke. *Intensive Care Med* 2007;33(9): 1587-93
52. Idris I, Hill R, Ross I, Sharma JC. N-terminal probrain natriuretic peptide predicts 1-year mortality following acute stroke: possible evidence of occult cardiac dysfunction among patients with acute stroke. *Age Ageing* 2010;39(6):752-5
53. Shibazaki K, Kimura K, Iguchi Y, et al. Plasma brain natriuretic peptide predicts death during hospitalization in acute ischaemic stroke and transient ischaemic attack patients with atrial fibrillation. *Eur J Neurol* 2011;18(1):165-9
54. Rost NS, Biffi A, Cloonan L, et al. Brain natriuretic peptide predicts functional outcome in ischemic stroke. *Stroke* 2012; 43(2):441-5
55. Hajdinjak E, Klemen P, Grmec S. Prognostic value of a single prehospital measurement of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and troponin T after acute ischaemic stroke. *J Int Med Res* 2012; 40(2):768-76
56. Chen X, Zhan X, Chen M, et al. The prognostic value of combined NT-pro-BNP levels and NIHSS scores in patients with acute ischemic stroke. *Intern Med* 2012; 51(20):2887-92
57. Kimura K, Shibazaki K, Iguchi Y, et al. The combination of elevated BNP and AF as a predictor of no early recanalization after IV-t-PA in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2010;290(1-2):37-40
58. Modrego PJ, Boned B, Berlanga JJ, Serrano M. Plasmatic B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in hyperacute stroke as markers of CT-evidence of brain edema. *Int J Med Sci* 2008;5(1):18-23
59. Montaner J, García-Berrocso T, Mendioroz M, et al. Brain natriuretic peptide is associated with worsening and mortality in acute stroke patients but adds no prognostic value to clinical predictors of outcome. *Cerebrovasc Dis* 2012;34(3):240-5
60. Stewart LA, Parmar MKB. Meta-analysis of the literature or of individual patient data: is there a difference? *Lancet* 1993;341(8842): 418-22
61. Leone MA, Brainin M, Boon P, et al. Guidance for the preparation of neurological management guidelines by EFNS scientific task forces - revised recommendations 2012. *Eur J Neurol* 2013; 20(3):410-19
62. Tzoulaki I, Siontis KC, Evangelou E, Ioannidis JP. Bias in associations of emerging biomarkers with cardiovascular disease. *JAMA Intern Med* 2013;173(8): 664-71
63. Whiteley W, Tseng MC, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke. A systematic review. *Stroke* 2008;39(10):2902-9
64. Meisel C, Schwab JM, Prass K, et al. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(10):775-86
65. Egea-Guerrero JJ, Muñoz-Sánchez MA, Murillo-Cabezas F. Immune depression after spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Med Intensiva* 2014. [Epub ahead of print]
66. Wester P, Puu G, Reiz S, et al. Increased monoamine metabolite concentrations and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with acute stroke. *Acta Neurol Scand* 1987;76(6):473-9
67. Assayag EB, Shenhar-Tsafaty S, Ofek K, et al. Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. *Mol Med* 2010;16(7-8):278-86

68. Journey TH, Cockrell JL Jr, Lindberg JS, et al. Spectrum of serum cortisol response to ACTH in ICU patients-correlation with degree of illness and mortality. *Chest* 1987; 92(2):292-5
69. Wade CE, Lindberg JS, Cockrell JL, et al. Upon-admission adrenal steroidogenesis is adapted to the degree of illness in intensive care unit patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(2):223-7
70. Korsic M, Brinar V, Plavsic V, et al. Some aspects of adrenocortical stress response following stroke. *Acta med Iugosl* 1990; 44(2):137-45
71. Murros K, Fogelholm R, Kettunen S, Vuorela AL. Serum cortisol and outcome in ischemic brain infarction. *J Neurol Sci* 1993;116(1):12-17
72. Slowik A, Turaj W, Pankiewicz J, et al. Hypercortisolemia in acute stroke is related to the inflammatory response. *J Neurol Sci* 2002;196(1-2):27-32
73. Christensen H, Boysen G, Johannesen HH. Serum-cortisol reflects severity and mortality in acute stroke. *J Neurol Sci* 2004;217(2): 175-80
74. Anne M, Juha K, Timo M, et al. Neurohormonal activation in ischemic stroke: effects of acute phase disturbances on long-term mortality. *Curr Neurovasc Res* 2007;4(3):170-5
75. Neidert S, Katan M, Schuetz P, et al. Anterior pituitary axis hormones and outcome in acute ischaemic stroke. *J Intern Med* 2011;269(4):420-32
76. Schwartz S, Schwab S, Klinga K, et al. Neuroendocrine changes in patients with acute space occupying ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(6): 725-7
77. Reding M, Orto L, Willensky P. The dexamethasone suppression test. An indicator of depression in stroke but not a predictor of rehabilitation outcome. *Arch Neurol* 1985;42(3):209-12
78. Fassbender K, Schmidt R, Mossner R, Daffertshofer M, Hennerici M. Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute stroke: relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome. *Stroke* 1994;25(6):1105-8
79. Barugh AJ, Gray P, Shenkin SD, et al. Cortisol levels and the severity and outcomes of acute stroke: a systematic review. *J Neurol* 2014;261(3):533-45
- **Well-conducted systematic review on a surrogate prognostic marker underlying its limitations.**
80. Joynt RJ, Feibel JH, Sladek CM. Antidiuretic hormone levels in stroke patients. *Ann Neurol* 1981;9(2):182-4
81. Barreca T, Gandolfo C, Corsini G, et al. Evaluation of the secretory pattern of plasma arginine vasopressin in stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2001;11(2): 113-18
82. Preibisz JJ, Sealey JE, Laragh JH, et al. Plasma and platelet vasopressin in essential hypertension and congestive heart failure. *Hypertension* 1983;5(2):1129-38
83. Katan M, Christ-Crain M. The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness. *Swiss Med Wkly* 2010;24(140):w13101
84. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. *Peptides* 2005;26(12): 2500-4
85. Katan M, Fluri F, Morgenthaler NG, et al. Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol* 2009;66(6):799-808
86. Tu WJ, Dong X, Zhao SJ, et al. Prognostic value of plasma neuroendocrine biomarkers in patients with acute ischaemic stroke. *J Neuroendocrinol* 2013;25(9):771-8
87. Zhang X, Lub XM, Huang LF, Yea H. Copeptin is associated with one-year mortality and functional outcome in patients with acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Peptides* 2012;33(2): 336-41
88. Fung C, De Marchis GM, Katan M, et al. Copeptin as a marker for severity and prognosis of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *PLoS One* 2013;8(1):e53191
89. De Marchis GM, Katan M, Weck A, et al. Copeptin adds prognostic information after ischemic stroke. Results from the CoRisk study. *Neurology* 2013;80(14):1278-86
- **Well-designed large, prospective study on the additional predictive value of a biomarker over clinical information.**
90. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986;7(3): 177-88
91. Duval S, Tweedie R. Trim and fill: a simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000;56(2):455-63
92. Zweifel C, Katan M, Schuetz P, et al. Copeptin is associated with mortality and outcome in patients with acute intracerebral hemorrhage. *BMC Neurol* 2010;10:34
93. Yu WH, Wang WH, Dong XQ, et al. Prognostic significance of plasma copeptin detection compared with multiple biomarkers in intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta* 2014;433C:174-8
94. Urwyler SA, Schuetz P, Fluri F, et al. Prognostic value of copeptin: one-year outcome in patients with acute stroke. *Stroke* 2010;41(7):1564-71
95. Tu WJ, Chen H, Cui LH. Prognostic value of copeptin in patients with acute ischemic stroke. *Iran J Neurol* 2011;10(3-4):58
96. Zhang JL, Yin CH, Zhang Y, et al. Plasma copeptin and long-term outcomes in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2013; 128(6):372-80
97. Dong X, Tao DB, Wang YX, et al. Plasma copeptin levels in Chinese patients with acute ischemic stroke: a preliminary study. *Neurol Sci* 2013;34(9):1591-5
98. Fluri F, Morgenthaler NG, Mueller B, et al. Copeptin, procalcitonin and routine inflammatory markers-predictors of infection after stroke. *PLoS One* 2012; 7(10):e48309
99. Ulm L, Ohlraun S, Harms H, et al. Stroke adverse outcome is associated with nosocomial infections (STRAWINSKI): procalcitonin ultrasensitive-guided antibacterial therapy in severe ischemic stroke patients – rationale and protocol for a randomized controlled trial. *Int J Stroke* 2013;8(7):598-603
- **Well-designed, multicenter, semi-interventional trial incorporating a biomarker in clinical decision-making.**

## MÉTODOS Y RESULTADOS. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICIÓN

***3.2. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke. A systematic review and meta-analysis. Bustamante A, et al. J Neuroimmunol. 2014; 274: 215-224***



## Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: A systematic review and meta-analysis



Alejandro Bustamante<sup>a,b</sup>, Tomás Sobrino<sup>c</sup>, Dolores Giralt<sup>a</sup>, Teresa García-Berrocó<sup>a</sup>, Víctor Llombart<sup>a</sup>, Iratxe Ugarriza<sup>d</sup>, Marc Espadaler<sup>a</sup>, Noelia Rodríguez<sup>b</sup>, Cathie Sudlow<sup>e</sup>, Mar Castellanos<sup>f</sup>, Craig J. Smith<sup>g</sup>, Manuel Rodríguez-Yáñez<sup>c</sup>, Ulrike Waje-Andreassen<sup>h</sup>, David Tanne<sup>i</sup>, Jun Oto<sup>j</sup>, Mark Barber<sup>k</sup>, Hans Worthmann<sup>l</sup>, Katja E. Wartenberg<sup>m</sup>, Kyra J. Becker<sup>n</sup>, Baidarbhi Chakraborty<sup>o</sup>, Seung-Hun Oh<sup>p</sup>, William N. Whiteley<sup>e</sup>, José Castillo<sup>c</sup>, Joan Montaner<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Neurology Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Neurology, Clinical Neurosciences Research Laboratory, University Clinical Hospital, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

<sup>d</sup> Neurology Department, Hospital de Cruces, Bilbao, Spain

<sup>e</sup> Centre for Clinical Brain Sciences, University of Edinburgh, UK

<sup>f</sup> Department of Neurology, Hospital Universitario Dr. Josep Trueta of Girona, Biomedical Research Institute of Girona, Spain

<sup>g</sup> Stroke and Vascular Research Centre, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Salford Royal NHS Foundation Trust, UK

<sup>h</sup> Department of Neurology, Haukeland University Hospital, Norway

<sup>i</sup> Sagol Neuroscience Center, Chaim Sheba Medical Center and Tel Aviv University, Israel

<sup>j</sup> University of Tokushima Graduate School, Japan

<sup>k</sup> Stroke Managed Clinical Network, NHS Lanarkshire, UK

<sup>l</sup> Department of Neurology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>m</sup> Department of Neurology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany

<sup>n</sup> Department of Neurology and Neurological Surgery, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, United States

<sup>o</sup> Department of Biochemistry, Dr. D. Y. Patil Medical College, Mumbai, India

<sup>p</sup> Department of Neurology, CHA Bundang Medical Center, CHA University, Seongnam, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 June 2014

Received in revised form 16 July 2014

Accepted 17 July 2014

#### Keywords:

Stroke

Interleukin-6

Outcome

Meta-analysis

Post-stroke infection

Individual participant data analysis

### ABSTRACT

We aimed to quantify the association of blood interleukin-6 (IL-6) concentrations with poor outcome after stroke and its added predictive value over clinical information. Meta-analysis of 24 studies confirmed this association with a weighted mean difference of 3.443 (1.592–5.294) pg/mL, despite high heterogeneity and publication bias. Individual participant data including 4112 stroke patients showed standardized IL-6 levels in the 4th quartile were independently associated with poor outcome (OR = 2.346 (1.814–3.033),  $p < 0.0001$ ). However, the additional predictive value of IL-6 was moderate (IDI = 1.5%, NRI = 5.35%). Overall these results indicate an unlikely translation of IL-6 into clinical practice for this purpose.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** IL-6, interleukin-6; mRS, modified Rankin Scale; BI, Barthel Index; WMD, weighted mean difference; IPD, individual participant data; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; OR, odds ratio; CI, confidence interval; ROC, receptor operating characteristic; NRI, net reclassification improvement; IDI, integrated discrimination improvement; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; AUC, area under the ROC curve.

\* Corresponding author at: Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Pg. Vall d'Hebron, 119-129, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 489 4073; fax: +34 93 489 4015.

E-mail address: [31862jmv@comb.cat](mailto:31862jmv@comb.cat) (J. Montaner).

### 1. Introduction

Accurately predicting stroke outcome is challenging. Despite the wide number of factors that may influence stroke prognosis, it has been suggested that they could be simplified as the interaction between baseline characteristics of the patient, such as age, gender or stroke severity (Appelros et al., 2003; Saposnik et al., 2008; Wahlgren et al., 2008), and several circumstances that occur after stroke leading to a poor outcome, such as those related to acute therapies (resistance to



recanalization, reocclusions, hemorrhagic transformation), edema or increased intracranial pressure, or post-stroke infections (Koennecke et al., 2011; Grube et al., 2013). These latter factors represent a unique opportunity for clinicians and researchers to intervene and modify stroke outcome. Even though some blood biomarkers have shown a significant association with neurological deterioration, three-months disability or mortality (Whiteley et al., 2009a), at present there is no biomarker that has proved to be useful for these purposes in the clinical setting, and it is still uncertain whether blood biomarkers add information to simple predictive models based on clinical variables, such as age and severity of stroke (Montaner et al., 2012; Whiteley et al., 2012). Furthermore, a good biomarker should be associated not just with an end point but also with a decision-making process to make easier its translation to clinical practice.

Cerebral ischemia triggers an inflammatory response characterized by the up-regulation of inflammatory cytokines within the brain, as well as in peripheral blood (del Zoppo et al., 2000). Although the over expression of interleukin-6 (IL-6) by astrocytes and microglia may have a dual role in acute ischemia, with both neurotoxic and neuroprotective roles attributed to this cytokine (Van Wagoner and Benveniste, 1999; Muller, 2002), blood levels of IL-6 have been repeatedly associated with poor outcome (Smith et al., 2004; Waje-Andreassen et al., 2005) after stroke. The reason for this association, however, is not fully understood. IL-6 concentration in blood has been correlated with baseline stroke severity, suggesting a plausible role as a biomarker of acute cerebral injury (Orion et al., 2008; Whiteley et al., 2012), but circulating IL-6 may also be related to other factors such as post-stroke infections (Wartenberg et al., 2011). Whether determination of IL-6 adds predictive value to prognostic models of stroke outcome in terms of additional predictive value is also unclear (Orion et al., 2008; Whiteley et al., 2012). Systematic review and meta-analysis of candidate biomarkers has been proposed as an evidence-generating approach (Garcia-Berrocso et al.,

2013a), which may confer a Class II level of evidence for a diagnostic tool (Leone et al., 2013). In this study, our main objective was to evaluate and quantify the association of IL-6 with functional outcome after stroke. Secondary objectives were to explore its added predictive value over clinical information and to assess whether specific causes of poor outcome could underlie this association.

## 2. Material and methods

### 2.1. Search

We searched PubMed up to October 2013. A combination of MeSH terms and text words for the terms “stroke”, “IL-6” and “outcome”, using 75 different entry terms, was applied (Supplementary data, S1). Duplicated studies were considered only once. Reference lists of the included articles and reviews that were identified in the search (Laskowitz et al., 1998; Whiteley et al., 2009a; Whiteley et al., 2009b) were hand-searched.

Three authors screened articles considering studies for potential inclusion if they recruited ischemic stroke patients, measured serum or plasma IL-6 concentration during hospitalization and reported long-term (to at least one month) functional outcome with a validated disability scale. Exclusion criteria were language other than English or Spanish; experimental studies with stroke models; reviews or abstracts from conferences, letters, editorials, and case reports; studies reporting outcome just as neurological scores or survival rate; and interventional studies or clinical trials.

### 2.2. Data extraction and quality assessment

Using a standard template (Supplementary Data, S2), three authors performed the data extraction. Discrepancies were resolved by discussion,

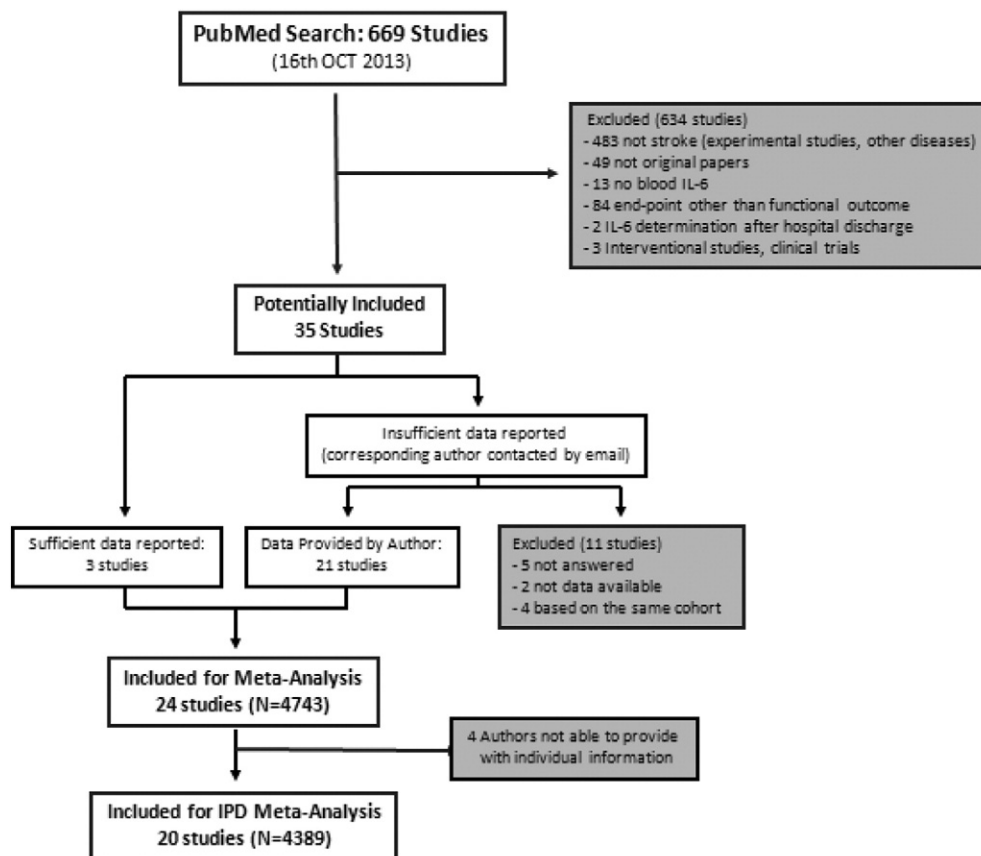


Fig. 1. Flow chart.

**Table 1**  
Overview of the articles included in the literature-based meta-analysis.

Author, year	Material	Assay	Time of blood collection	Sample size	Disability Scale	Time of outcome assessment	Disability rate	IL-6 poor outcome (pg/mL)	IL-6 good outcome (pg/mL)	Baseline NIHSS	Age	Gender (% males)	Post-stroke infections
Vila et al. (2000)	Plasma	ELISA R&D systems	<48 h	44	mRS	6 months	47.8%	28.3 ± 25.1	15.1 ± 20	–	–	54.5%	–
Castellanos et al. (2002)	Plasma	ELISA R&D systems	<24 h	113	BI	3 months	23%	23.3 ± 9.5	15.6 ± 9.3	8 (6–9)	70 (66–76)	57%	0%
Castillo et al. (2003)	Plasma	ELISA R&D systems	<24 h	283	BI	3 months	43.2%	34.6 ± 18.6	19.2 ± 13.1	–	68 (62–73)	49.8%	–
Smith et al. (2004)	Plasma	ELISA	<12 h	37	mRS	3 months	72.9%	43.3 ± 58.8	9.8 ± 1.8	13 (10–18.5)	69 (60–79.5)	65%	25.0%
Waje-Andreassen et al. (2005)	Serum	ELISA R&D systems	<4 h	11	BI	1 year	50%	4.4 ± 3.2	3.8 ± 2.1	9 (4–21)	75 (64–78)	54.5%	45.5%
Blanco et al. (2006)	Plasma	ELISA R&D systems	<24 h	113	BI	3 months	31.9%	23.4 ± 9.6	15.6 ± 9.4	–	70 (66–76)	57.5%	–
Rodríguez-Yañez et al. (2006)	Plasma	ELISA R&D systems	<24 h	844	mRS	3 months	38.8%	27.5 ± 18.3	14.5 ± 11.6	–	70 (65–76)	55.5%	–
Domac et al. (2007)	Plasma	Immunotech Enzyme Immunoassay	–	70	mRS	2 months	81%	51.1 ± 22.9	36 ± 19.5	–	68.5 ± 8.7	33 (47%)	–
Orion et al. (2008)	Plasma	ELISA R&D Systems	<36 h	98	mRS	3 months	46.9%	6.3 ± 5.2	3.8 ± 3.3	4 (2–10)	65 (56–73)	65%	–
Oto et al. (2008)	Plasma	ELISA ENDOGEN	<8 h	19	mRS	1 month	47.4%	3.6 ± 4.5	2.5 ± 3.4	8 (4.5–16.5)	70 (60–54)	56.8%	–
Basic-Kes et al. (2008)	Serum	Chemiluminescence (EURO/DPC)	<12 h	68	mRS	3 months	65%	23.7 ± 29.1	12.9 ± 26.6	–	70 (73–83)	48.5%	–
Welsh et al. (2009)	Plasma	ELISA R&D systems	<24 h	176	mRS	1 month	52%	11.9 ± 7.2	6.8 ± 6.5	10 (8–15)	72 (63–81)	44.7%	–
Whiteley et al. (2009a)	Serum and plasma	ELISA R&D systems	13 days (median)	844	mRS	6 months	28%	7.7 ± 5.6	4.6 ± 4.0	3 (2–9)	76.1 (68–83)	48.5%	–
Worthmann et al. (2010)	Serum	Immulin 2000	<6 h	69	mRS	3 months	27.5%	11.7 ± 13	7.5 ± 6.6	2 (1–7.5)	74 (66–82)	50.7%	0%
Brea et al. (2011)	Serum	Immulin 1000	<12 h	110	mRS	3 months	56%	18.1 ± 18.9	9.3 ± 8	10 (4–15)	76 (69–81)	56.4%	–
Rodríguez-González et al. (2011)	Serum	Immulin 1000	<12 h	129	mRS	3 months	42.6%	28.1 ± 7.9	18.9 ± 3.9	9 (4–14)	74 (65–79)	58.1%	–
Wartenberg et al. (2011)	–	Immulin DPC	<24 h	94	mRS	3 months	55%	19.8 ± 3.1	9.7 ± 2	9.5 (6–14)	71.5 (65–80)	46.9%	42.7%
Zierath et al. (2011)	Plasma	Fluorokine MAP (R&D systems)	<72 h	84	mRS	3 months	39.3%	21.2 ± 39.2	3.64 ± 7.06	6 (2–16.5)	54 (43–66)	62.4%	12.6%
Whiteley et al. (2012)	Serum and plasma	ELISA (R&D systems)	<24 h	268	mRS	3 months	66.7%	7.4 ± 4.0	4.16 ± 3.38	3 (2–9)	73 (64–80)	52.7%	9.3%
Chakraborty et al. (2013)	Serum	ELISA Diaclone research	<24 h	98	mRS	3 months	33.7%	42.4 ± 42	24.5 ± 67	7.5 (4–11)	54 (48–60)	31%	0%
Zeng et al. (2013)	Pma	ELISA (R&D systems)	<72 h	105	mRS	3 months	61.9%	2 ± 2.19	0.94 ± 1.44	–	–	69.5%	16%
Park et al. (2013)	Serum and plasma	ELISA	6–24 h	175	mRS	3 months	36.7%	61.1 ± 111.9	10.8 ± 48.1	5 (3–10)	67 (59–75)	54.3%	–
Rodríguez et al. (2013)	Serum	Immulin 1000	<12 h	76	mRS	3 months	51.3%	12.3 ± 9.5	8 ± 3.7	14 (9–18)	69.5 (59–76)	58%	–
Rodríguez-Yañez et al. (2013)	Serum	Immulin 1000	<12 h	595	mRS	3 months	46.7%	23.6 ± 17.6	17.9 ± 11.1	12 (7–17)	73 (66–78)	54.3%	–

IL-6: interleukin-6; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; mRS: modified Rankin Scale; BI: Barthel Index.

and missing information was requested by contacting the corresponding authors. For those articles including both ischemic and hemorrhagic stroke, isolated data for ischemic stroke was obtained. The incidence of post stroke complications associated with poor outcome, such as hemorrhagic transformation and in-hospital infections, was also recorded when available. Poor outcome was defined a priori as modified Rankin Scale (mRS) >2 or Barthel Index (BI) <85.

The quality of the articles was assessed using a 15-point questionnaire for the evaluation of biomarker studies in stroke (García-Berrocóso et al., 2013a, S3). All the articles fulfilling inclusion criteria were included in the meta-analysis independently of the quality score.

### 2.3. Statistical analysis

#### 2.3.1. Literature-based meta-analysis

All included studies after systematic review were synthesized regarding IL-6 levels and its association with long-term functional outcome after stroke. Weighted mean differences (WMD) were calculated between poor and good outcome groups for each independent article and for all studies together. WMD test was chosen in order to compare continuous values for IL-6 in both groups. Heterogeneity among studies was assessed by Cochrane Q and I-squared statistics (DerSimonian and Laird, 1986) and, as heterogeneity was present, effect size was estimated by random effects model. We conducted a meta-regression to adjust the results by the following potential confounders: time of blood collection, time of outcome assessment, type of sample (serum or plasma), disability scale used, quality score of each article, age, gender, baseline stroke severity and prevalence of post-stroke complications. We used funnel plot to assess publication bias and Duval-Tweedie nonparametric “trim-and-fill” test (Duval and Tweedie, 2000) to assess the effect of publication bias on the WMD.

#### 2.3.2. Individual participant data (IPD) analysis

Corresponding authors of the included studies provided individual anonymized data on a template described in Supplementary material S4. A unique cohort including all individual information was used for a

complete statistical analysis. To avoid differences between cohorts, IL-6 values were standardized calculating the Z-score value for each cohort by subtracting the mean and dividing by its standard deviation (SD). 2 units were added to each value to avoid negative results. As standardized IL-6 levels had a non-normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test with  $p < 0.05$ ), Mann–Whitney U and Kruskal–Wallis tests were applied and data were reported as median and interquartile range (IQR). Pearson Chi-squared test assessed differences among categorical variables. A logistic regression model for the prediction of poor functional outcome was developed with all the baseline variables that were associated with poor outcome in univariate analysis, by the forward-stepwise method. Odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI), and p-value were given. Using the highest quartile cut-off point, standardized IL-6 levels were added to the logistic regression models including clinical variables. Comparisons of areas under the receiver operating characteristic (ROC) curves (AUC) from models including biomarkers or not were performed following DeLong's method (DeLong et al., 1988). Net reclassification improvement (NRI) and integrated discrimination improvement (IDI) indexes were used to assess the added value of the biomarker over the clinical predictive model for poor functional outcome (Pencina et al., 2008). For the NRI test, pre-specified that clinically relevant thresholds of predicted risk (<10% and >90%) were used (García-Berrocóso et al., 2013a; García-Berrocóso et al., 2014). These thresholds reflect the accuracy needed to give clinical recommendations such as indication of potentially hazardous management (Whiteley et al., 2012). Finally, we conducted new forward-stepwise logistic regression analyses for prediction of each of the post-stroke complications reported by the studies, using baseline clinical variables associated with post-stroke infections in univariate analysis and then adding IL-6 levels in the highest quartile in the last step.

STATA 10.0 (StataCorp, College Station, TX), R 2.15 (R Development Core Team, 2012; Vienna, Austria; Hmisc and PredictABEL packages) and SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) software were used for statistical analyses. In all cases, a  $p < 0.05$  was considered significant at a 95% confidence level.

**Table 2**

Literature-based meta-analysis. Quality assessment<sup>a</sup>.  
From García-Berrocóso et al., 2013a, 2013b.

Author, year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Quality score
Vila et al. (2000)	+	+	+	–	–	+	+	–	?	–	+	–	–	+	+	8
Castellanos et al. (2002)	+	–	+	+	–	–	–	+	?	+	+	–	+	+	–	8
Castillo et al. (2003)	+	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	–	9
Smith et al. (2004)	+	+	+	–	–	+	?	+	+	+	+	–	–	+	+	10
Waje-Andreassen et al. (2005)	+	–	+	–	–	+	?	+	?	+	+	–	–	+	+	8
Blanco et al. (2006)	+	+	+	–	+	+	?	–	?	+	+	–	+	+	–	9
Rodríguez-Yáñez et al. (2006)	+	+	+	–	–	+	?	–	–	–	+	–	+	+	+	8
Orion et al. (2008)	?	?	+	+	+	+	–	–	?	–	+	–	–	+	+	7
Oto et al. (2008)	+	+	+	–	–	+	?	–	?	+	+	–	+	+	+	9
Basic et al. (2008)	+	–	+	–	–	+	?	+	+	+	+	–	–	+	+	9
Welsh et al. (2009)	?	?	+	–	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	9
Whiteley et al. (2009b)	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	13
Worthmann et al. (2010)	+	+	+	–	–	+	?	+	+	+	+	–	+	+	+	11
Brea et al. (2011)	+	+	+	–	–	+	?	+	+	+	+	–	–	+	+	10
Rodríguez-González et al. (2011)	+	+	+	+	+	+	?	+	+	–	+	+	–	+	+	12
Wartenberg et al. (2011)	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	11
Domac et al. (2007)	+	–	+	+	–	+	?	–	?	+	+	–	–	+	+	8
Zierath et al. (2011)	+	+	+	–	–	+	?	+	+	+	+	–	–	+	+	10
Whiteley et al. (2012)	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–	+	+	12
Chakraborty et al. (2013)	+	–	+	–	–	+	?	–	?	+	+	–	–	+	+	7
Zeng et al. (2013)	+	+	+	–	–	+	–	+	?	+	+	–	–	+	+	9
Park et al. (2013)	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	–	+	+	+	13
Rodríguez et al. (2013)	+	–	+	+	–	+	?	+	+	–	+	+	–	+	–	9
Rodríguez-Yáñez et al. (2013)	?	?	+	+	–	+	–	+	+	–	+	–	+	+	+	9
TOTAL	21	15	24	10	6	23	1	16	14	18	24	2	10	24	20	9 (7–13)

<sup>a</sup> Points 1–15 denote items included in the quality questionnaire and they are available as supplementary data (S3). Briefly, 1–2 evaluate stroke diagnosis assessment; 3, independency between biomarker and outcome; 4–5 evaluate study blinding; 6, explanation of withdrawals; 7, reference for the biomarker; 8, disclosure statement; 9–12, study design; 13, statistical analysis; 14, biomarker measurement and 15, absence of selection bias. (+) indicates fulfilling of the criterion, (–) not fulfillment and (?) indicates that fulfilling is unknown or not applicable. The total score is the sum of the fulfilled criteria.

The protocol for the systematic review and meta-analyses was previously registered and published in the PROSPERO database (CRD42013004434). We prepared the manuscript fulfilling PRISMA statement (Moher D. et al., 2009).

**3. Results**

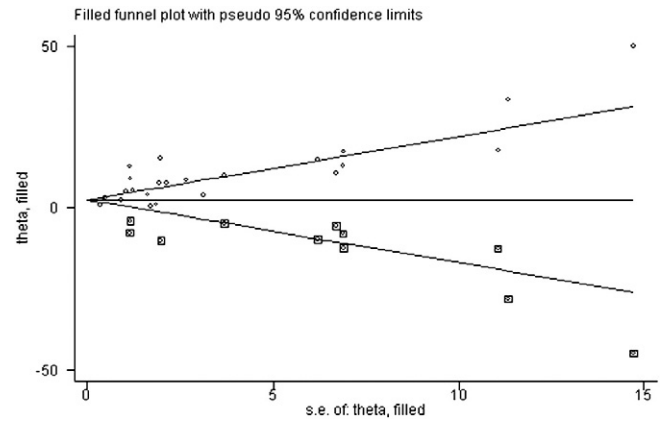
**3.1. Search**

Our search revealed 669 articles, of which 634 were initially excluded in the first screening (Fig. 1). From 35 potentially includible articles only 3 had all the necessary information to be included in the meta-analysis, with the level of IL-6 expressed as mean ± SD being the most frequently missed variable. The corresponding authors of the other 32 studies were contacted by e-mail to request additional data. All authors but 7 provided us with the information and 4 more studies were excluded at this point as being repeated cohorts. Finally, 24 studies were included in the literature-based meta-analysis.

**3.2. Data extraction and quality assessment**

An overview of the main characteristics of the included articles is shown in Table 1. Briefly, most of the articles reported disability by assessing mRS at 3 months. There were wide variations in both baseline stroke severity and proportion of patients with a poor functional outcome. Regarding potential causes of neurological deterioration and poor outcome, the incidence of post-stroke infection was reported in just 9 of the articles (N = 879), and only one reported other complications such as hemorrhagic transformation or edema (N = 76).

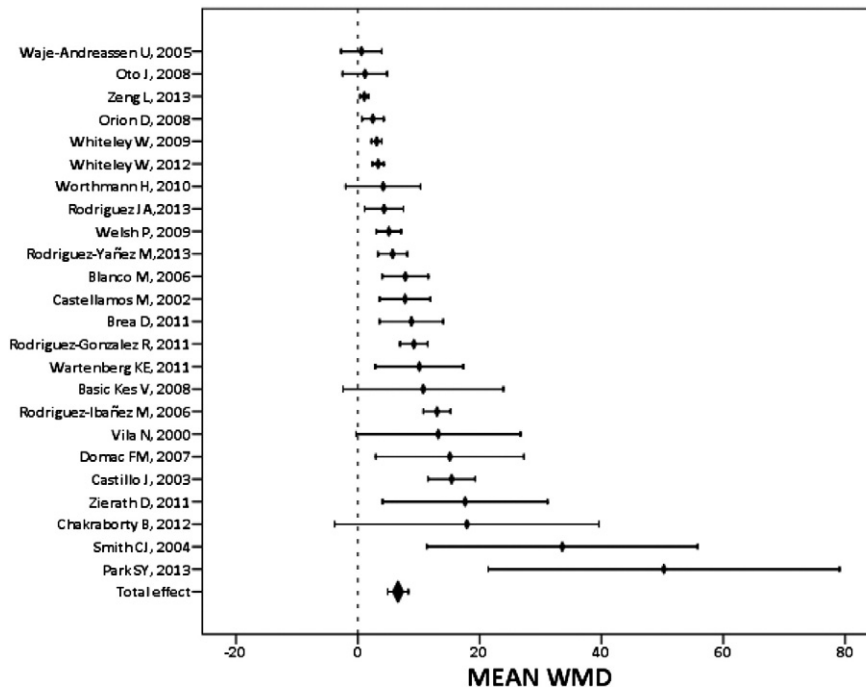
The quality of the included articles was moderate (median 9 points, range 7–13). Reporting of blinded design (10/24 for biomarker measurement and 6/24 for clinical data collection), use of pre-established cut-off points (1/24) and previous calculation of the sample size (2/24) were the most frequently missed items (Table 2).



**Fig. 3.** Funnel plot. Horizontal line represents the global effect size, and oblique lines, 95% confidence intervals. Circles are plotted as effect size and their standard error from published articles. Squares represent the studies in which the effect size was estimated.

**3.3. Literature-based meta-analysis**

The 24 included studies aggregated 4523 ischemic stroke patients. Although there was a high heterogeneity between studies ( $Q = 236.52, I^2 = 90.3\%, p < 0.001$ ), when IL-6 levels were compared between disabled and non-disabled patients, the former group showed on average an increase of 6.602 pg/mL (4.908–8.296,  $p < 0.0001$ ), Fig. 2. No considered factor was shown to be a modifier of this effect in the meta-regression, but there was a trend towards a reduction in the effect size of IL-6 in studies with higher median values of baseline NIHSS ( $p = 0.092$ ). Although publication bias was present (Fig. 3), the association remained significant when the Duval–Tweedie test was applied [3.443 pg/mL (1.592–5.294);  $p < 0.001$ ].



**Fig. 2.** Forest plot. Horizontal lines represent weighted mean differences (WMD) and 95% confidence intervals for interleukin-6 levels in pg/mL between patients with poor and good functional outcome for each study and for all studies together.

**Table 3**  
Baseline characteristics of each cohort and compiled cohort of the individual participant data analysis.

	Castellanos 2002 (N = 113)	Castillo 2003 (N = 283)	Smith 2004 (N = 36)	Waje-Adreassen 2005 (N = 11)	Blanco 2006 (N = 111)	Rodriguez-Yañez 2006 (N = 844)	Orion 2008 (N = 95)	Oto 2008 (N = 19)	Welsh 2009 (N = 215)	Whiteley 2009 (N = 259)
Age	70 (66–76)	68 (62–73)	69 (60–79.5)	75 (64–78)	70 (66–76)	70 (65–76)	65 (56–73)	70 (60–74)	72 (63–81)	76.1 (68.2–83.3)
Gender (male)	56.6%	49.8%	63.9%	54.5%	57.7%	55.5%	69.5%	57.9%	44.7%	48.6%
Smoker	23.9%	–	–	0%	45.0%	–	19.1%	10.5%	36.8%	23.4%
Arterial hypertension	53.6%	33.9%	66.7%	45.5%	53.2%	52.3%	53.7%	57.9%	51.2%	–
Diabetes mellitus	31%	36.7%	5.6%	0%	44.1%	25.8%	32.6%	42.1%	15.3%	13.1%
Dyslipidemia	–	–	44.4%	33.3%	–	–	62.1%	31.6%	25.6%	–
Atrial fibrillation	11.5%	23.7%	22.2%	18.2%	–	29.6%	11.6%	31.6%	13%	26.7%
Previous stroke	30.0%	–	19.4%	36.4%	31.5%	0%	24.2%	15.8%	22.3%	27.0%
Previous disability	–	0%	13.9%	0%	–	–	5.4%	0%	18.1%	12.0%
NIHSS	8 (6–9)	–	13 (10–18.5)	9 (4–21)	–	–	4 (2–10)	8 (4.5–16.5)	10 (8–15)	3 (2–9)
TOAST										
Atherothrombotic	13.3%	52.7%	36.1%	0%	0%	44.1%	15.3%	47.4%	–	–
Cardioembolic	20.4%	47.3%	25.0%	54.5%	0%	39.7%	20.8%	26.3%	–	–
Lacunar	63.7%	0%	13.9%	9.1%	100%	10.2%	40.3%	26.3%	–	–
Undetermined	2.7%	0%	25.0%	36.4%	0%	6%	23.6%	0%	–	–
Post-stroke infections	0%	–	25.0%	45.5%	–	–	–	–	–	–

NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST: Stroke Etiology according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification.

### 3.4. Individual participant data analysis

After excluding missing values for IL-6 and functional outcome, and hemorrhagic strokes, we obtained individual information from 4112 patients belonging to 20 studies. Characteristics of each study and the whole cohort are summarized in Table 3. A wide variation of IL-6 levels among studies was noted, especially regarding time from blood withdrawal and assay type (Supplementary material, S5). IL-6 was associated with poor outcome, with the normalized IL-6 levels in patients with poor outcome 16.8 (8.5–53.1) vs. 5.0 (1.3–12.7) in patients with good outcome;  $p < 0.0001$ . Furthermore, IL-6 was associated with post stroke infections (35.1 (10.8–183.4) vs. 7.4 (1.9–17.0);  $p < 0.0001$ ), Table 4.

In the logistic regression analysis, age, gender and stroke severity were independently associated with poor functional outcome. Baseline stroke severity was not always available, and the sample size of the predictive model including baseline NIHSS was relatively small (2179). To overcome this issue we developed another logistic regression model without this variable, in which age and gender were the variables associated with poor outcome ( $N = 4112$ ). IL-6 levels in the 4th quartile were an independent predictor of poor outcome in both models (OR: 2.346 (1.81–3.03),  $p < 0.001$ ) in the model including age, gender and NIHSS and OR: 3.630 ((3.12–4.22),  $P < 0.001$ , in the model without NIHSS), but its additional predictive value was modest in terms of AUC (0.840 to 0.847;  $p < 0.0001$  and 0.602 to 0.619;  $p = 0.0035$ , respectively); rates of discrimination (1.5% and 7%, respectively, both  $p < 0.0001$ ) and reclassification (5.35%,  $p < 0.0001$  for the first model), Fig. 4, Table 5.

From the reported complications, only post-stroke infection on the first week reached sufficient sample size for analyses. Infections were independently associated with poor functional outcome when included in the first step of the logistic regression analysis, giving a final model composed by age (OR: 1.31 (1.01–1.05),  $p < 0.001$ ); baseline NIHSS (OR: 1.35 (1.29–1.43),  $p < 0.001$ ); post-stroke infections (OR: 4.51 (2.18–9.32),  $p < 0.001$ ) and IL-6 (OR: 2.18 (1.28–3.71),  $p = 0.004$ ). The effect of IL-6 on its prediction was further analyzed in a cohort of 701 patients from 8 studies, in which the independent association between IL-6 and functional outcome was maintained. The mean characteristics of this cohort are summarized in Supplementary material S6. Standardized IL-6 levels in the 4th quartile were also an independent predictor for the development of infections [OR: 2.617 (1.466–4.670),  $p = 0.001$ ], together with baseline NIHSS [OR: 1.142 (1.096–1.190),

$p < 0.001$ ], hypertension [OR: 4.413 (2.250–8.659),  $p < 0.001$ ] and dyslipidemia [OR: 0.312 (0.173–0.562),  $p < 0.001$ ].

## 4. Discussion

Our study confirmed the association of IL-6 levels with poor functional outcome after stroke, independent of age, gender and stroke severity. However, the additional predictive value in terms of discrimination between poor and good outcomes and reclassification to highest or lowest risk categories over these clinical variables was modest, although statistically significant. We were able to perform a comprehensive analysis, including more than 4700 patients, with enough statistical power to test this association. Our results confirmed the presence of higher circulating IL-6 levels in those patients with poor outcome, as previously reported (Smith et al., 2004; Oto et al., 2008; Basic-Kes et al., 2008). However, we evidenced a high heterogeneity among included studies, as well as publication bias, even with adjustments to correct for both factors.

Negative studies are less likely to be accepted for publication and the lack of publication of negative results could lead to an overestimation of the biomarker effect when performing meta-analyses (Tzoulaki et al., 2013). To our knowledge, just one study (Sotgiu et al., 2006), which is less than would be expected by chance, reported an inverse association between IL-6 levels and functional outcome. Unfortunately we were not able to include this study in our meta-analysis because data could not be provided.

The main strength of our study is the IPD analysis, which allowed us to adjust by covariates related to stroke prognosis (Stewart and Parmar, 1993). Although the logistic regression models showed IL-6 was an independent predictor of poor functional outcome after stroke, the main interest of this study is that IL-6 showed a slight but significant additional predictive value over clinical data, even in the model which included stroke severity.

If a marker could predict not just a good or poor outcome, but which mechanism may lead to this outcome, its usefulness in clinical practice would be even more suitable. As previously suggested by others (Wartenberg et al., 2011; Zhang et al., 2012; Kwan et al., 2013), we noted a significant and independent association with post-stroke infections. Post-stroke infections are frequent and influence the rates of mortality and poor outcome (Langhorne et al., 2000; Koennecke et al., 2011). A panel of biomarkers including IL-6 with others such as procalcitonin or copeptin (Hug et al., 2011; Fluri et al., 2012) might be



Worthmann 2010 (N = 69)	Brea 2011 (N = 101)	Rodriguez-Gonzalez 2011 (N = 129)	Wartember 2011 (N = 96)	Zierath 2011 (N = 103)	Whiteley 2012 (N = 691)	Chakraborty 2013 (N = 98)	Park 2013 (N = 175)	Rodriguez 2013 (N = 69)	Rodriguez-Yañez 2013 (N = 595)	FULL DATABASE (N = 4112)
74 (66.5–82.5)	76 (69–81)	74 (65–79)	71.5 (65–80)	54 (43–65.5)	73 (64.7–80.7)	54 (48–60)	67 (59–75)	69.5 (58.7–75.7)	73 (66–78)	71 (63–78)
50.7%	57.4%	58.1%	46.9%	67.0%	52.7%	30.6%	54.3%	58.0%	54.3%	53.5%
13%	17.2%	17.8%	–	37.6%	32.6%	18.4%	40.6%	34.8%	14.1%	26.1%
68.1%	59.4%	62.8%	87.4%	51.5%	54.3%	44.9%	57.7%	59.4%	60.7%	54.6%
13%	17.8%	25.6%	36.8%	25.2%	12.4%	25.0%	30.3%	21.7%	21.2%	22.9%
49.3%	42.6%	23.3%	33.3%	70.9%	–	81.6%	24%	49.3%	26.2%	36.5%
30.4%	21.8%	25.6%	–	14.6%	16.5%	6.1%	30.3%	36.2%	33.3%	24.1%
18.8%	8.9%	8.5%	33.3%	36.9%	29.8%	0%	0%	4.3%	10.4%	15.6%
0%	–	–	–	–	–	–	0%	–	–	6.9%
2 (1–7.5)	10 (4–15)	9 (4–14)	9.5 (6–14)	6 (2–16.5)	–	7.5 (4–11)	5 (3–10)	14 (9–18)	12 (7–17)	8 (4–14)
23.2%	41.6%	41.9%	50%	20.3%	–	36.6%	29.7%	55.1%	46.1%	39.5%
26.1%	5.9%	17.8%	23.9%	39.2%	–	18.9%	28%	20.3%	18.3%	28.2%
26.1%	7.9%	11.6%	0%	13.5%	–	22.1%	21.7%	23.2%	8.4%	16.2%
24.6%	44.6%	28.7%	26.1%	27.0%	–	22.1%	20.6%	1.4%	27.2%	16.0%
0%	–	–	42.7%	12.6%	–	0%	16%	–	–	13.7%

used to detect those patients at the highest risk of infection and thus more likely to worsen. As we were not able to adjust the results by the time of onset of infection and the time of IL-6 measurement in this substudy, prospective studies should address the question of whether IL-6 acts as a predictor of infection development or is a marker of simultaneous evolving infection, and the optimal time-point for the measurement.

Our meta-analysis has some limitations. First, there were differences in methodology among the included articles, for both the method of analysis and time of blood collection. This could have an influence on the results, although in the meta-regression they did not modify the significance of the effect. Second, in the sub-analysis of poor outcome relating to post-stroke complications, our conclusions should be carefully interpreted because of limited sample size: information about post-stroke infections was based on just 8 studies including 701 patients, and diagnosis of infection also differed among studies. Other post-stroke complications such as hemorrhagic transformation or edema were reported in just one study and therefore, could not be analyzed. In addition, concurrent inflammatory conditions

that could affect baseline IL-6 levels were not available in every study. In fact, most of the studies excluded such patients, although this might reduce the applicability of their results. Specifically, authors were asked about pre-stroke infections and these patients were included in 2 studies, so this confounding variable could not be analyzed. Third, since heterogeneity between studies was present, we standardized IL-6 values for comparisons, which did not allowed us to look for a cut-off point discriminating between good and poor outcome in stroke patients that could be clinically useful. Fourth, the lack of baseline stroke severity data in some of the studies did not allow us to perform a comprehensive analysis in the whole cohort with the most accurate logistic regression model. Finally, the inclusion of studies in English and Spanish solely may have led to some small bias, but is unlikely to have altered the findings.

In conclusion, our study revealed an independent association of IL-6 and stroke outcome. However, the existence of heterogeneity and publication bias in the literature-based meta-analysis and the modest increment in discrimination and reclassification suggests currently no additive role of measuring IL-6 for predicting stroke prognosis in clinical practice. Therefore, IL-6 measurement might only become useful to clinicians in the prediction of outcome integrated in a panel in combination with other outcome biomarkers that have proven usefulness, such as Copeptin (de Marchis et al., 2013), gelsolin, dihydropyrimidinase-related protein 2 or cystatin A (Garcia-Berrocó et al., 2013b). Even when the influence of post-stroke complications in this association has not been adequately studied through the literature, our results suggest an association with the development of post-stroke infections which could provide a way to translate IL-6 measurement in acute stroke to clinical practice. The utility of including IL-6 in such a prognostic multi-marker panel should be explored in prospective multicentre studies to dissect the global value and the specific validity of IL-6 for infectious post-stroke complications. Those studies should also give us information about the optimal timing for measuring these markers and to obtain the best predictive value after stroke onset.

#### Acknowledgments

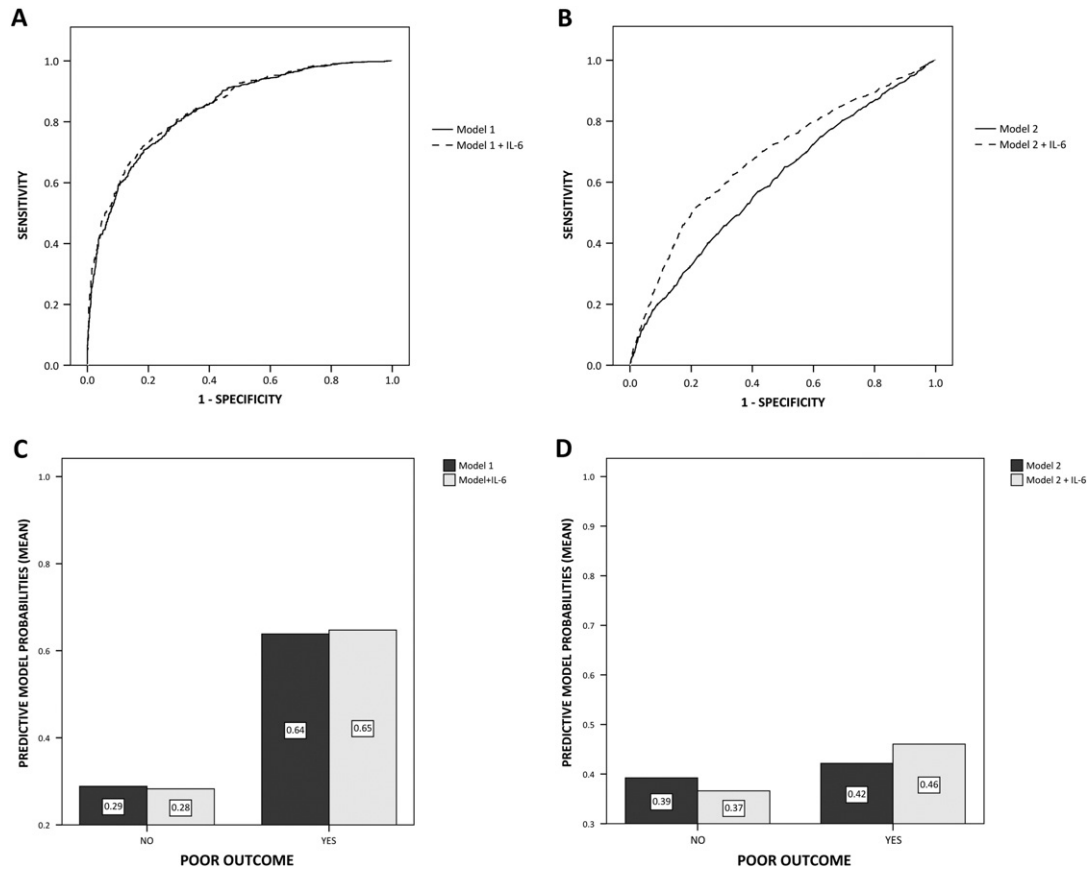
Alejandro Bustamante is supported by a Rio Hortega contract CM/00265 from the Instituto de Salud Carlos III. V.L. is supported by a pre-doctoral fellowship from Vall Hebrón Institute of Research.

**Table 4**

Clinical and demographic variables associated with IL-6 levels.

Factors	Standardized IL-6 levels (pg/mL) (N = 4112)		
	Yes	No	p-Value
Age	R = 0.126		<0.0001
Gender (male)	8.2 (2.0–21.8)	9.7 (3.0–18.8)	0.695
Smoker	6.0 (1.4–15.9)	10.0 (3.0–24.7)	0.183
Arterial hypertension	8.5 (2.3–24.7)	9.5 (2.7–19.0)	0.005
Diabetes mellitus	6.1 (1.2–21.7)	10.0 (2.88–20.0)	0.011
Dyslipidemia	10.0 (4.1–21.9)	6.1 (1.3–18.8)	0.954
Atrial fibrillation	12.0 (7.38–33.3)	6.7 (1.7–18.0)	<0.0001
Baseline NIHSS	R = 0.256		<0.0001
TOAST			<0.0001
Atherothrombotic	8.0 (1.9–28.5)		
Cardioembolic	11.65 (5.8–21.9)		
Lacunar	4.8 (1.2–12.3)		
Undetermined	9.0 (2.3–20.0)		
Infections	35.1 (10.8–183.4)	7.4 (1.9–17.0)	<0.0001
Poor Outcome	16.8 (8.5–53.1)	5.0 (1.3–12.7)	<0.0001
Mortality	80.9 (23.4–115.0)	7.5 (2.1–17.0)	<0.0001

IL-6: Interleukin-6; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST: Stroke Etiology according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification.



**Fig. 4.** Additional predictive value of interleukin-6 (IL-6) over clinical variables. A and B represent the areas under the curve of the predictive models 1 (age, gender and stroke severity) and 2 (age and gender) including or not the biomarker information. C and D represent the additional discriminative ability of both models for good and poor outcome with and without biomarker information. In both cases, IL-6 levels is standardized and dichotomized above the 4th quartile.

Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005) and is supported on stroke biomarkers research by FIS 11/0176.

The authors are grateful to Ana Maria Simundic (Zagreb, Croatia) and Guo-Yuan Yang (Shangai, China) for contributing data for the literature-based meta-analysis.

**Table 5**

Logistic regression models and additional predictive value assessment of IL-6.

		Predictive models for poor functional outcome			
		Age, gender and baseline NIHSS N = 2179	Age, gender and baseline NIHSS + IL-6 N = 2179	Age and gender N = 4112	Age and gender + IL-6 N = 4112
Logistic regression (OR)	Age	1.041 (1.032–1.050), p < 0.0001	1.038 (1.029–1.048), p < 0.0001	1.029 (1.023–1.035), p < 0.0001	1.025 (1.019–1.031), p < 0.0001
	Male gender	1.271 (1.030–1.568), p = 0.026	1.304 (1.053–1.616), p = 0.015	1.288 (1.135–1.462), p < 0.0001	1.331 (1.167–1.519), p < 0.0001
	Baseline NIHSS	1.256 (1.231–1.281), p < 0.0001	1.243 (1.218–1.269), p < 0.0001	–	–
	IL-6	–	2.346 (1.814–3.033), p < 0.0001	–	3.630 (3.121–4.222), p < 0.0001
ROC curves	AUC	0.840 (0.824–0.857)	0.847 (0.831–0.863)	0.602 (0.584–0.619)	0.681 (0.664–0.698)
Categorical NRI	p-Value	Ref.	0.0035	Ref.	<0.0001
	NRI poor outcome	–	2.88%	–	<sup>a</sup>
	NRI good outcome	–	2.47%	–	<sup>a</sup>
	Total NRI	–	5.35% (3.02–7.69)	–	<sup>a</sup>
IDI statistics	p-Value	Ref.	<0.0001	Ref.	<sup>a</sup>
	IDI poor outcome	–	0.006	–	0.028
	IDI good outcome	–	0.009	–	0.042
	Total IDI	–	0.015 (0.010–0.023)	–	0.070 (0.062–0.078)
	p-Value	Ref.	<0.0001	Ref.	<0.0001

IL-6: Standardized levels of Interleukin-6 in the 4th quartile; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; ROC: Receptor Operating Characteristic; AUC: Area under the curve; NRI: Net Reclassification Index; IDI: Integrated Discrimination Improvement. To develop the first model, the variables introduced in the first step were those associated with long-term functional outcome in univariate analysis: IL-6, age, gender, hypertension, tobacco, diabetes mellitus, atrial fibrillation, alcohol, baseline NIHSS, previous disability, TOAST classification, tPA treatment and glycemia.

<sup>a</sup> The test could not be performed because any of the models, with and without the biomarker, was able to reclassify any patient into <10% or >90% risk category.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.015>.

## References

- Appelros, P., Nydevik, I., Viitanen, M., 2003. Poor outcome after first-ever stroke: predictors for death, dependency, and recurrent stroke within the first year. *Stroke* 34, 122–126.
- Basic-Kes, V., Simundic, A.M., Nikolac, N., Topic, E., Demarin, V., 2008. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome. *Clin. Biochem.* 41, 1330–1334.
- Blanco, M., Castellanos, M., Rodríguez-Yáñez, M., Sobrino, T., Leira, R., Vivancos, J., Lizasoain, I., Serena, J., Dávalos, A., Castillo, J., 2006. High blood pressure and inflammation are associated with poor prognosis in lacunar infarctions. *Cerebrovasc. Dis.* 22, 123–129.
- Brea, D., Sobrino, T., Rodríguez-Yáñez, M., Ramos-Cabrer, P., Agulla, J., Rodríguez-González, R., Campos, F., Blanco, M., Castillo, J., 2011. Toll-like receptors 7 and 8 expression is associated with poor outcome and greater inflammatory response in acute ischemic stroke. *Clin. Immunol.* 139, 193–198.
- Castellanos, M., Castillo, J., García, M.M., Leira, R., Serena, J., Chamorro, A., Dávalos, A., 2002. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke* 33, 982–987.
- Castillo, J., Moro, M.A., Blanco, M., Leira, R., Serena, J., Lizasoain, I., Dávalos, A., 2003. The release of tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann. Neurol.* 54, 811–819.
- Chakraborty, B., Chowdhury, D., Vishnoi, G., Goswami, B., Kishore, J., Agarwal, S., 2013. Interleukin-6 gene – 174 G/C promoter polymorphism predicts severity and outcome in acute ischemic stroke patients from north India. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 22, 683–689.
- De Marchis, G.M., Katan, M., Weck, A., Fluri, F., Foerch, C., Findling, O., Schuetz, P., Buhl, D., El-Koussy, M., Gensicke, H., Seiler, M., Morgenthaler, N., Mattle, H.P., Mueller, B., Christ-Crain, M., Arnold, M., 2013. Copeptin adds prognostic information after ischemic stroke: results from the CoRisk study. *Neurology* 80, 1278–1286.
- del Zoppo, G., Ginis, I., Hallenbeck, J.M., Iadecola, C., Wang, X., Feuerstein, G.Z., 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 10, 95–112.
- DeLong, E.R., DeLong, D.M., Clarke-Pearson, D.L., 1988. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44, 837–845.
- DerSimonian, R., Laird, N., 1986. Meta-analysis in clinical trials. *Control. Clin. Trials* 7, 177–188.
- Domac, F.M., Somay, G., Misirli, H., Erenoglu, N.Y., 2007. Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke. *Neurosciences (Riyadh)* 12, 25–30.
- Duval, S., Tweedie, R., 2000. Trim and fill: a simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 56, 455–463.
- Fluri, F., Morgenthaler, N.G., Mueller, B., Christ-Crain, M., Katan, M., 2012. Copeptin, procalcitonin and routine inflammatory markers-predictors of infection after stroke. *PLoS One* 7, e48309.
- García-Berrococo, T., Giral, D., Bustamante, A., Etgen, T., Jensen, J.K., Sharma, J.C., Shibasaki, K., Saritas, A., Chen, X., Whiteley, W.N., Montaner, J., 2013a. B-type natriuretic peptides and mortality after stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 81, 1976–1985.
- García-Berrococo, T., Penalba, A., Boada, C., Giral, D., Cuadrado, E., Colomé, N., Dayon, L., Canals, F., Sanchez, J.C., Rosell, A., Montaner, J., 2013b. From brain to blood: new biomarkers for ischemic stroke prognosis. *J. Proteomics* 94, 138–148.
- García-Berrococo, T., Giral, D., Bustamante, A., Llombart, V., Rubiera, M., Penalba, A., Boada, C., Espadaler, M., Molina, C., Montaner, J., 2014. Role of beta-defensin-2 and interleukin-4 receptor as stroke outcome biomarkers. *J. Neurochem.* 129, 463–472.
- Grube, M.M., Koennecke, H.C., Walter, G., Meisel, A., Sobesky, J., Nolte, C.H., Wellwood, L., Heuschmann, P.U., 2013. Influence of acute complications on outcome 3 months after ischemic stroke. *PLoS One* 24, e75719.
- Hug, A., Murlle, B., Dalpke, A., Zorn, M., Liesz, A., Veltkamp, R., 2011. Usefulness of serum procalcitonin levels for the early diagnosis of stroke-associated respiratory tract infections. *Neurocrit. Care* 14, 416–422.
- Koennecke, H.C., Belz, W., Berfelde, D., Endres, M., Fitzek, S., Hamilton, F., Kreitsch, P., Mackert, B.M., Nabavi, D.G., Nolte, C.H., Pohls, W., Schmehl, I., Schmitz, B., von Brevener, M., Walter, G., Heuschmann, P.U., 2011. Factors influencing in-hospital mortality and morbidity in patients treated on a stroke unit. *Neurology* 77, 965–972.
- Kwan, J., Horsfield, G., Bryant, T., Gawne-Cain, M., Durward, G., Byrne, C.D., Englyst, N.A., 2013. IL-6 is a predictive biomarker for stroke associated infection and future mortality in the elderly after an ischemic stroke. *Exp. Gerontol.* 48, 960–965.
- Langhorne, P., Stott, D.J., Robertson, L., MacDonald, J., Jones, L., McAlpine, C., Dick, F., Taylor, G.S., Murray, G., 2000. Medical complications after stroke: a multicenter study. *Stroke* 31, 1223–1229.
- Laskowitz, D.T., Grocott, H., Hsia, A., Copeland, K.R., 1998. Serum markers of cerebral ischemia. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 7, 234–241.
- Leone, M.A., Brainin, M., Boon, P., Pugliatti, M., Keindl, M., Bassetti, C.L., 2013. Guidance for the preparation of neurological management guidelines by EFNS scientific task forces – revised recommendations 2012. *Eur. J. Neurol.* 20, 410–419.
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G., The PRISMA Group, 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 6, e1000097.
- Montaner, J., García-Berrococo, T., Mendioroz, M., Palacios, M., Perea-Gainza, M., Delgado, P., Rosell, A., Slevin, M., Ribó, M., Molina, C.A., Alvarez-Sabín, J., 2012. Brain natriuretic peptide is associated with worsening and mortality in acute stroke patients but adds no prognostic value to clinical predictors of outcome. *Cerebrovasc. Dis.* 34, 240–245.
- Muller, B., 2002. Cytokine imbalance in non-immunological disease. *Cytokine* 18, 334–339.
- Orion, D., Schwammethal, Y., Reshef, T., Schwartz, R., Tsabari, R., Merzeliak, O., Chapman, J., Mekori, Y.A., Tanne, D., 2008. Interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute brain ischaemia. *Eur. J. Neurol.* 15, 323–328.
- Oto, J., Suzue, A., Inui, D., Fukuta, Y., Hosotsubo, K., Torii, M., Nagahiro, S., Nishimura, M., 2008. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients. *J. Anesth.* 22, 207–212.
- Park, S.Y., Kim, J., Kim, O.J., Kim, J.K., Song, J., Shin, D.A., Oh, S.H., 2013. Predictive value of circulating interleukin-6 and heart-type fatty acid binding protein for three months clinical outcome in acute cerebral infarction: multiple blood markers profiling study. *Crit. Care* 17, R45.
- Pencina, M.J., D'Agostino Sr., R.B., D'Agostino Jr., R.B., Vasan, R.S., 2008. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat. Med.* 27, 157–172.
- Development Core Team, R., 2012. A Language and Environment for Statistical Computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 3-900051-07-0 (URL <http://www.R-project.org/>).
- Rodríguez, J.A., Sobrino, T., Orbe, J., Purroy, A., Martínez-Vila, E., Castillo, J., Páramo, J.A., 2013. proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* 11, 1464–1473.
- Rodríguez-González, R., Sobrino, T., Rodríguez-Yáñez, M., Millán, M., Brea, D., Miranda, E., Moldes, O., Pérez, J., Lomas, D.A., Leira, R., Dávalos, A., Castillo, J., 2011. Association between neuroserpin and molecular markers of brain damage in patients with acute ischemic stroke. *J. Transl. Med.* 9, 58.
- Rodríguez-Yáñez, M., Castellanos, M., Blanco, M., García, M.M., Nombela, F., Serena, J., Leira, R., Lizasoain, I., Dávalos, A., Castillo, J., 2006. New-onset hypertension and inflammatory response/poor outcome in acute ischemic stroke. *Neurology* 67, 1973–1978.
- Rodríguez-Yáñez, M., Castellanos, M., Sobrino, T., Brea, D., Ramos-Cabrer, P., Pedraza, S., Castiñeiras, J.A., Serena, J., Dávalos, A., Castillo, J., Blanco, M., 2013. Interleukin-10 facilitates the selection of patients for systemic thrombolysis. *BMC Neurol.* 13, 62.
- Saposnik, G., Hill M.D., O'Donnell M., Fang, J., Hachinski V., Kapral M.K., Registry of the Canadian Stroke Network for the Stroke Outcome Research Canada (SORCan) Working Group, 2008. Variables associated with 7-day, 30-day, and 1-year fatality after ischemic stroke. *Stroke* 39, 2318–2324.
- Smith, C.J., Emsley, H., Gavin, C.M., Georgiou, R.F., Vail, A., Barberan, E.M., del Zoppo, G.J., Hallenbeck, J.M., Rothwell, N.J., Hopkins, S.J., Tyrrell, P.J., 2004. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 4, 2.
- Sotgiu, S., Zanda, B., Marchetti, B., Fois, M.L., Arru, G., Pes, G.M., Salaris, F.S., Arru, A., Pirisi, A., Rosati, G., 2006. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur. J. Neurol.* 13, 505–513.
- Stewart, L.A., Parmar, M.K.B., 1993. Meta-analysis of the literature or of individual patient data: is there a difference? *Lancet* 341, 418–422.
- Tzoulaki, I., Siontis, K.C., Evangelou, E., Ioannidis, J.P., 2013. Bias in associations of emerging biomarkers with cardiovascular disease. *JAMA Int. Med.* 173, 664–671.
- Van Wagoner, N.J., Benveniste, E.N., 1999. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 100, 124–139.
- Vila, N., Reverter, J.C., Yagüe, J., Chamorro, A., 2000. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 325–329.
- Wahlgren, N., Ahmed, N., Eriksson, M., Aichner, F., Bluhmki, E., Dávalos, A., Eriälä, T., Ford, G.A., Grund, M., Hacke, W., Hennerici, M.G., Kaste, M., Köhrmann, M., Larrue, V., Lees, K.R., Machnig, T., Roine, R.O., Toni, D., Vanhooren, G., 2008. Multivariable analysis of outcome predictors and adjustment of main outcome results to baseline data profile in randomized controlled trials: Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-MONitoring Study (SITS-MOST). *Stroke* 39, 3316–3322.
- Waje-Andreassen, U., Krakenes, J., Ulvestad, E., Thomassen, L., Myhr, K.M., Aarseth, J., Vedeler, C.A., 2005. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol. Scand.* 111, 360–365.
- Wartenberg, K.E., Stoll, A., Funk, A., Meyer, A., Schmidt, J.M., Berrouschot, J., 2011. Infection after acute ischemic stroke: risk factors, biomarkers, and outcome. *Stroke Res Treat.* 2011, 830614.
- Welsh, P., Barber, M., Langhorne, P., Rumley, A., Lowe, G.D., Stott, D.J., 2009. Associations of inflammatory and haemostatic biomarkers with poor outcome in acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 27, 247–253.
- Whiteley, W., Chong, W.L., Sengupta, A., Sandercock, P., 2009a. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 40, 380–389.
- Whiteley, W., Jackson, C., Lewis, S., Lowe, G., Rumley, A., Sandercock, P., Wardlaw, J., Dennis, M., Sudlow, C., 2009b. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS Med.* 6, e1000145.
- Whiteley, W., Wardlaw, J., Dennis, M., Lowe, G., Rumley, A., Sattar, N., Welsh, P., Green, A., Andrews, M., Sandercock, P., 2012. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke* 43, 86–91.



- Worthmann, H., Tryc, A.B., Goldbecker, A., Ma, Y.T., Tountopoulou, A., Hahn, A., Dengler, R., Lichtinghagen, R., Weissenborn, K., 2010. The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc. Dis.* 30, 85–92.
- Zeng, L., Liu, J., Wang, Y., Wang, L., Weng, S., Chen, S., Yang, G.Y., 2013. Cocktail blood biomarkers: prediction of clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke. *Eur. Neurol.* 69, 68–75.
- Zhang, X., Wang, F., Zhang, Y., Ge, Z., 2012. Risk factors for developing pneumonia in patients with diabetes mellitus following acute ischaemic stroke. *J. Int. Med. Res.* 40, 1860–1865.
- Zierath, D., Tanzi, P., Cain, K., Shibata, D., Becker, K., 2011. Plasma  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone predicts outcome in ischemic stroke. *Stroke* 42, 3415–3420.

## MÉTODOS Y RESULTADOS. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN

***3.3. Factor seven activating protease (FSAP) predicts response to intravenous thrombolysis in acute ischaemic stroke. Bustamante A, et al. Int J Stroke 2015 [Epub ahead of print]***

# **FACTOR SEVEN ACTIVATING PROTEASE (FSAP) PREDICTS RESPONSE TO INTRAVENOUS THROMBOLYSIS IN ACUTE ISCHAEMIC STROKE**

*Alejandro Bustamante, MD<sup>1</sup>; Belén Díaz-Fernández, MD<sup>2</sup>; Dolors Giralt, MsC<sup>1</sup>; Sandra Boned, MD<sup>2</sup>; Jorge Pagola, MD, PhD<sup>2</sup>; Carlos A. Molina MD, PhD<sup>2</sup>; Teresa García-Berrocó, PhD<sup>1</sup>; Sandip M. Kanse, PhD<sup>3</sup>; Joan Montaner, MD, PhD<sup>1,2\*</sup>.*

1. Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.
2. Stroke Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.
3. Institute of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway.

\*Corresponding author: Joan Montaner MD., PhD. Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Pg. Vall d'Hebron, 119-129, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain. Phone N: 34 93 489 4073. Fax N: 34 93 489 4015. Email: 31862jmv@comb.cat

## **ABSTRACT**

**Background:** Prediction of recanalization after intravenous thrombolysis could be important to direct secondary reperfusion techniques. Factor seven activating protease (FSAP) has been described to have a relevant pathophysiological role in stroke.

**Aims:** To determine whether plasma FSAP levels are associated with recanalization after tPA in acute stroke.

**Methods:** FSAP antigen, activity and FSAP-inhibitor complexes were measured in 120 acute stroke patients admitted to Hospital Vall d'Hebron with arterial occlusions, before intravenous thrombolysis. Recanalization was assessed by transcranial Doppler 2h after thrombolysis. Predictors of recanalization were determined by logistic regression analysis and the additional predictive value of FSAP over them was determined by integrated discrimination improvement (IDI) index.

**Results:** Complete recanalization was achieved in 31 patients. FSAP antigen levels were lower in patients achieving recanalization (8.2(6.3-11.7) ug/mL vs. 9.8(7.6-12.8) ug/mL; p=0.046). After adjustment by age, sex and NIHSS, OCSF (OR=0.33 (0.13-0.82), p=0.017) and FSAP antigen (OR=3.22 (1.22-8.47), p=0.018) were independently associated with recanalization, and the addition of FSAP improved the model discrimination (IDI= 5.5% (1.4-9.7), p=0.009).

**Conclusions:** Our study showed that lower FSAP antigen plasma levels were associated with a higher chance of arterial recanalization after tPA treatment, suggesting an involvement of FSAP in tPA-induced clot lysis. FSAP antigen determination might be useful in predicting tPA response in stroke patients.

## **INTRODUCTION**

Stroke remains one of the main causes of death and disability worldwide [1]. After many years in which tissue plasminogen activator (tPA) has been the only approved treatment for acute ischaemic stroke, endovascular therapies have recently shown their efficacy in acute stroke patients with intracranial vessel occlusions [2-3]. However, candidates to these therapies need to be transferred in some cases, as the technical requirements for performing endovascular procedures are not available in every center, resulting in longer times to reperfusion. In this sense, a marker which is able to predict intravenous tPA response could be used for the early identification of those patients with a poor response in terms of recanalization, which

would be the best candidates for secondary reperfusion procedures.

Factor seven activating protease (FSAP) is a circulating serine protease predominantly produced in the liver, which can influence different pathways in relation to coagulation; it can activate the coagulation factor VII (FVII) and pro-urokinase plasminogen activator (pro-uPA) [4], and also inhibit tissue factor pathway inhibitor (TFPI). FSAP has a high homology with fibrinolytic and coagulation enzymes [5]. Beyond coagulation, FSAP is a potent inhibitor of smooth muscle cell proliferation and migration, specifically through its ability to cleave platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) [6]. The Marburg I single nucleotide polymorphism (SNP) in the HABP2 gene, encoding FSAP, may lead to a prothrombotic phenotype when it's

associated with reduced activation of pro-uPA [7]. A possible role for FSAP in human atherosclerosis was suggested by a study showing an association of the Marburg I polymorphism with advance atherogenesis in carotid arteries [8]. In fact, carriers of the polymorphism had an increased risk of stroke from 1.52 (1.05-2.19) in heterozygous subjects to 4.44 (1.42-13.90) in homozygous, suggesting a gene dosage effect [9].

Increased plasma FSAP antigen and activity levels have been recently associated with ischaemic stroke and its main aetiologic subtypes, suggesting a role in its pathophysiology [10]. In this study, we aimed to determine whether FSAP is associated with recanalization and outcome after tPA treatment.

## METHODS

### Patients and clinical protocol

From May-2003 to September-2007, patients with acute, non-lacunar stroke, admitted to the emergency department of our University Hospital within 3 hours from symptoms onset were prospectively studied. All of them had documented arterial occlusions by transcranial Doppler (TCD) ultrasound examination and no contraindications for reperfusion therapies. All of them were treated with tPA at a standard 0.9 mg/kg dose. Biomarker measurement was not possible in every case and therefore, 120 patients were randomly selected for FSAP measurement. Comparisons between patients with and without FSAP measurement is shown in Supplementary table 1.

**Table 1. Baseline characteristics of the whole cohort and according to 2-hour complete recanalization status**

	TOTAL (N=120)	COMPLETE RECANALIZATION (N=31)	NO RECANALIZATION (N=89)	p-value
Age	74.5 (62-81)	71 (58.5-83.5)	76 (63-80)	0.837
Sex (Female)	54.2%	56.7%	53.9%	0.795
Arterial Hypertension	61.7%	50%	65.2%	0.140
Diabetes	25%	23.3%	25.8%	0.784
Hyperlipidemia	32.5%	43.3%	29.2%	0.154
Tobacco consumption	17.8%	16.7%	18.4%	0.832
Atrial Fibrillation	35%	36.7%	33.7%	0.768
CAD	22.5%	33.3%	18%	0.078*
Previous Stroke	11.7%	10%	12.4%	0.729
SBP	149±29	152.3±28.6	147.9±29.3	0.486
DBP	78.9±14.7	76.3±13.9	80±15	0.251
Glycemia	120 (97-146)	118 (95-136.5)	120 (101-148)	0.601
Baseline NIHSS	16 (11-20)	14.5 (8-20)	17 (12-19)	0.249
Time from Onset (minutes)	175 (130-225)	192 (150-232.5)	165 (120-210)	0.206
Occluded MCA	90.8%	90.3%	91%	0.357
Artery BA	9.2%	9.7%	9%	
Proximal Occlusion	54.2%	40%	58.4%	0.080*
Early Ischaemic Signs on CT	14.7%	6.7%	17.6%	0.231
TOAST CE	52.1%	56.7%	50%	0.868
LAA	17.6%	13.3%	19.3%	
UND	26.1%	26.7%	26.1%	
UNC	4.2%	3.3%	4.5%	
OCSP PACI	21.8%	40%	14.8%	0.013**
TACI	68.1%	50%	75%	
POCI	10.1%	10%	10.2%	
IMPROVEMENT	52.7%	86.2%	37.1%	<0.0001**
WORSENING	14.3%	3.4%	19.4%	0.055*
POOR OUTCOME	58%	40.7%	63.9%	0.038**
FSAP ANTIGEN (ug/mL)	9.65 (7.0-12.8)	8.2 (6.3-11.7)	9.8 (7.6-12.8)	0.046**
FSAP ACTIVITY (U/mL)	1.01 (0.84-1.31)	1.1 (0.85-1.25)	0.99 (0.84-1.31)	0.968
FSAP-INHIBITOR COMPLEXES (ng/mL)	82 (21-242)	85.5 (37.5-182)	55 (21-260)	0.628

CAD: coronary artery disease; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; MCA: middle cerebral artery; BA: basilar artery; CT: computer tomography; TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment; CE: cardioembolic; LAA: large-artery atherothrombotic; UND: undetermined (stroke of undetermined aetiology); UNC: uncommon (other causes of stroke); OCSP: Oxfordshire Community Stroke Project; PACI: partial anterior circulation infarct; TACI: total anterior circulation infarct; POCI: posterior circulation infarct; FSAP: factor seven activating protease. \*  $p<0.1$  \*\*  $p<0.05$

Stroke severity was assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), and neurological improvement and worsening were defined as variations of  $\geq 4$  points in the score at 48 hours [11]. All patients underwent cerebral computer tomography (CT) at admission and it was repeated after 24-48 hours to exclude haemorrhagic transformation. Stroke aetiology was classified according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification. Stroke was also classified according to the Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP) criteria. For logistic regression analyses, OCSP was dichotomized into total anterior circulation infarct (TACI) vs. other types. Functional outcome was evaluated at 3 months using the modified Rankin Scale (mRS), and patients were considered to have poor outcome if mRS was  $>2$ . Clinical examinations and outcome assessment were recorded blinded to FSAP results. All patient or relatives signed informed consent and the study protocol was approved by the local ethics committee.

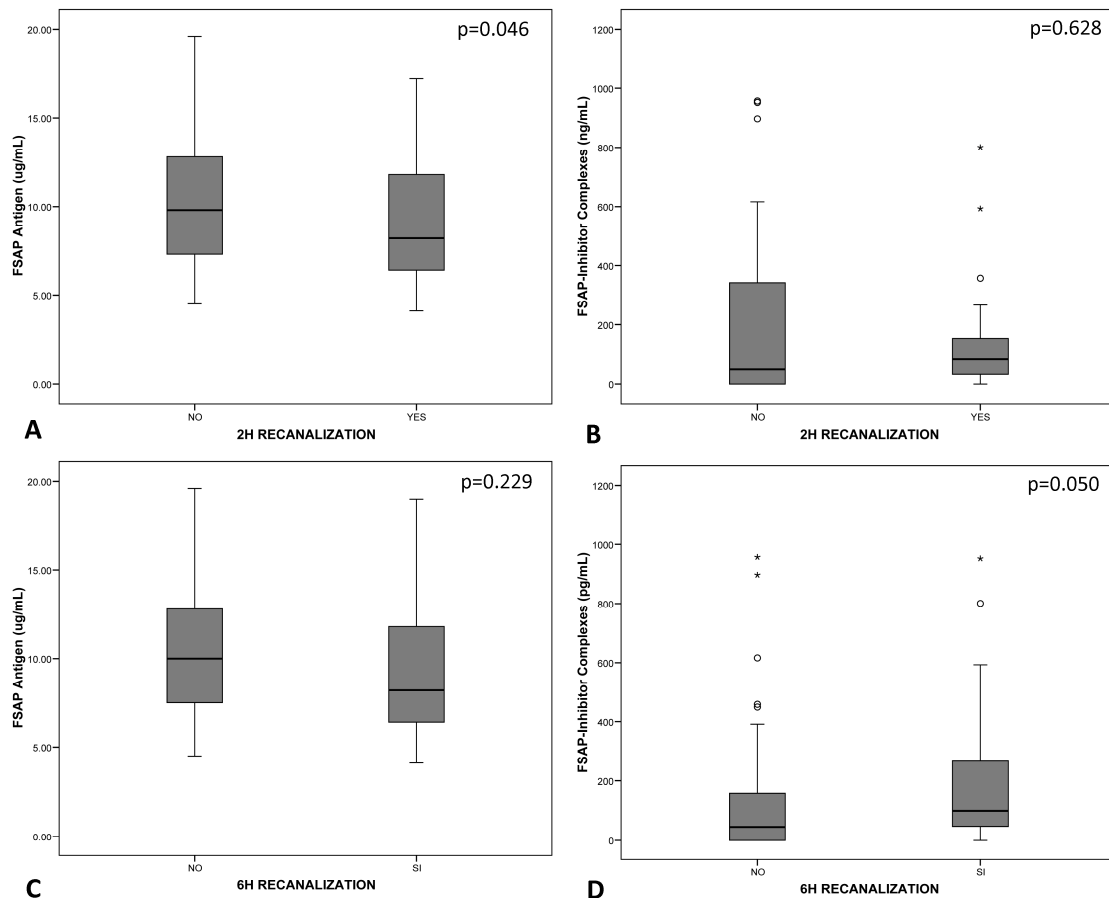
### Transcranial doppler protocol

A standard TCD examination was performed in the emergency room on admission before tPA administration using 1-channel 2-MHz equipment (TCD 100M, Spencer Technologies). A standard set of diagnostic criteria was applied to diagnose arterial occlusion. Proximal and distal

middle cerebral artery (MCA) occlusions were defined according to the Thrombolysis in Brain Ischaemia (TIBI) grading system [12]. To assess recanalization, follow-up recording was performed 2 and 6 hours after tPA bolus. Recanalization on TCD was considered if complete recanalization was achieved, if the end-diastolic flow velocity improved to normal or stenotic signals (TIBI 4-5), as previously validated for the diagnosis of tPA-induced recanalization [13].

### Blood sampling and FSAP measurement

Peripheral blood samples were drawn from each patient at admission, before tPA administration, in plasma EDTA tubes. In a subset of 20 patients, a second blood sample was drawn at 24 hours to look for kinetic changes on FSAP levels. Plasma was immediately separated by centrifugation at 1500g for 15 minutes at 4°C and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Levels of FSAP antigen ( $\mu\text{g/mL}$ ), FSAP activity ( $\text{U/mL}$ ), and FSAP-inhibitor complexes ( $\text{ng/mL}$ ) were measured. FSAP antigen and activity was measured by ELISA as previously described [14]. FSAP-inhibitor ( $\alpha 2$ -antiplasmin) complexes and nucleosomes were measured as described before [14] except that plasma FSAP was activated with histones ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour at  $37^{\circ}\text{C}$  to obtain the standard for this ELISA. All determinations were performed blinded to clinical data.



**Figure 1:** Differences in FSAP measures at both time points of recanalization assessment, 2 hours (A, B) and 6 hours (C, D). Boxplots represent median and interquartile range (IQR) of FSAP measures between patients with and without complete recanalization at the time point. FSAP levels are expressed as  $\mu\text{g/mL}$  (antigen, A and C) and  $\text{ng/mL}$  (FSAP-inhibitor complexes, B and D). Levels were compared by Mann-Whitney U test.

**Table 2. Factors associated with FSAP measurements**

	FSAP ANTIGEN (ug/mL)			FSAP ACTIVITY (U/mL)			FSAP- INHIBITOR COMPLEXES (ng/mL)		
	Correlation Coefficient (R)		P	Correlation Coefficient (R)		P	Correlation Coefficient (R)		P
<b>Age</b>	R=-0.018		0.845	R= 0.002		0.979	R= 0.075		0.414
<b>SBP</b>	R=-0.116		0.233	R=0.018		0.856	R=-0.040		0.678
<b>DBP</b>	R=0.079		0.416	R=-0.077		0.429	R=-0.070		0.471
<b>Glycemia</b>	R=0.019		0.850	R=-0.106		0.281	R=-0.075		0.445
<b>Baseline NIHSS</b>	R=0.011		0.906	R=0.121		0.187	R=0.187		0.036**
	<b>YES</b>	<b>NO</b>	<b>P</b>	<b>YES</b>	<b>NO</b>	<b>P</b>	<b>YES</b>	<b>NO</b>	<b>P</b>
<b>Sex (Female)</b>	10.4 (8.1-14.4)	8.6 (6.9-11)	0.009**	1.01 (0.86-1.22)	0.99 (0.83-1.35)	0.641	85 (29-211)	62 (20-249)	0.826
<b>Hypertension</b>	9.8 (7.2-12.3)	9.2 (7.7-13.1)	0.889	1 (0.84-1.26)	1 (0.85-1.24)	0.931	82 (19-266)	83 (34-160)	0.824
<b>Diabetes</b>	8.1 (6.3-12.8)	9.9 (7.9-12.3)	0.094*	0.99 (0.85-1.25)	1 (0.84-1.25)	0.899	67.5 (21-260)	83 (21-206)	0.727
<b>Hyperlipidemia</b>	9.2 (7.6-13)	9.9 (7.1-12.3)	0.847	0.98 (0.86-1.18)	1.02 (0.84-1.36)	0.492	83 (35-142.5)	83 (21-266)	0.425
<b>Tobacco</b>	8.3 (7.4-10.7)	10 (7.5-13.2)	0.036**	1.05 (0.86-1.36)	0.99 (0.84-1.22)	0.375	62 (17.4-138)	83 (33-242)	0.568
<b>Atrial Fibrillation</b>	9.8 (7.8-12.3)	9.4 (7-13.1)	0.903	1.09 (0.84-1.35)	0.99 (0.84-1.22)	0.305	91.5 (45-260)	72.5 (17.6-187)	0.323
<b>CAD</b>	8.1 (6.6-10.7)	9.9 (7.9-13)	0.030**	0.9 (0.82-1.17)	1.02 (0.85-1.26)	0.251	83 (35-167)	81 (19-266)	0.762
<b>TOAST</b>									
<b>CE</b>	9.8 (7.7-12.3)		0.733	1.01 (0.83-1.35)		0.301	84.5 (44-260)		0.485
<b>LAA</b>	8.2 (7.3-11.3)			0.93 (0.82-1.1)			45 (0-126)		
<b>UND</b>	10.4 (6.65-14.4)			1.05 (0.87-1.23)			91 (20-212)		
<b>UNC</b>	9.4 (4.5-11.8)			1.02 (0.98-1.24)			34 (21-908)		
<b>OCSP</b>									
<b>PACI</b>	8.7 (6.9-11.8)		0.045**	1.13 (0.84-1.24)		0.575	55 (17.6-153)		0.382
<b>TACI</b>	10.4 (7.8-9.5)			0.98 (0.84-1.25)			97 (29-266)		
<b>POCI</b>	8.3 (6-9.5)			1.02 (0.92-1.24)			43.5 (10.5-193.5)		
<b>Recanalization 2H</b>	8.2 (6.3-11.7)	9.8 (7.6-12.8)	0.046**	1.07 (0.82-1.25)	1 (0.84-1.24)	0.968	85.5 (36-211)	61 (21-218)	0.628
<b>Recanalization 6H</b>	8.2 (6.4-11.8)	10 (7.5-12.8)	0.299	1.08 (0.84-1.29)	0.97 (0.84-1.17)	0.192	109 (55-311)	46.5 (0-158)	0.050*
<b>Improvement</b>	8.7 (6.4-11.4)	9.8 ((8.1-14.1)	0.029**	1.09 (0.83-1.36)	0.96 (0.84-1.14)	0.179	88.5 (25-274)	62 (5-172.5)	0.370
<b>Worsening</b>	10.9 (9.2-12.3)	9 (6.9-12.3)	0.050**	0.96 (0.79-1.07)	0.99 (0.84-1.24)	0.411	157 (3-897)	83 (21-206)	0.641
<b>Poor Outcome</b>	10.4 (7.8-13.8)	9.1 (6.7-11.5)	0.088*	1.01 (0.85-1.31)	1.03 (0.84-1.25)	0.980	107 (34-293)	62 (21-160)	0.190

FSAP levels are presented as median (interquartile range) for categorical variables and as correlation coefficient (R) for continuous. CAD: coronary artery disease; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; CT: computer tomography; TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment; CE: cardioembolic; LAA: large-artery atherothrombotic; UND: undetermined (stroke of undetermined aetiology); UNC: uncommon (other causes of stroke); OCSP: Oxfordshire Community Stroke Project; PACI: partial anterior circulation infarct; TACI: total anterior circulation infarct; POCI: posterior circulation infarct; FSAP: factor seven activating protease. \* p<0.1 \*\* p<0.05

## Statistical analyses

Descriptive and frequency statistical analyses were obtained and comparisons were made using the SPSS 17.0 statistical package. Patients with and without recanalization were compared by Pearson's chi-square or Fisher's exact test for categorical variables. As FSAP measurements were not normally distributed, Mann-Whitney U test was used for continuous variables and Spearman test for correlations. Cut-off points with optimal accuracy for FSAP antigen, activity and FSAP-inhibitor complexes form were obtained with Receiver Operating Characteristic (ROC) curves. Logistic regression analysis was conducted to determine independent predictors of complete recanalization at 2 hours, by the forward-stepwise method, including in the first step variables associated with a p-value <0.1 in univariate analysis. The resulting model was further adjusted by age, sex and baseline NIHSS and, in the last step, biomarkers associated with the end-point were forced into the models by enter method. Predictive models including or not the biomarkers were compared by integrated discrimination improvement (IDI) index and C-statistics by the likelihood ratio method. For all comparisons, p-value <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

Table 1 shows baseline characteristics of the cohort and differences between groups according to 2-hour recanalization status. Associations between the different FSAP measurements and baseline characteristics of the stroke patients are shown in Table 2.

### FSAP and arterial recanalization

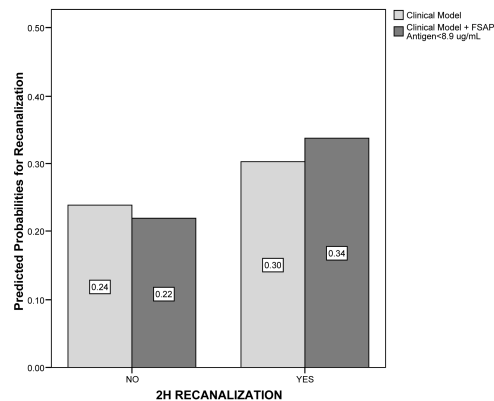
Two hours after tPA treatment, complete recanalization was achieved in 31 patients (25.8%). Patients who experienced recanalization had lower baseline FSAP antigen levels [8.2 (6.3-11.7) ug/mL vs. 9.8 (7.6-12.8) ug/mL; p=0.046]. Neither FSAP activity nor FSAP-inhibitor complexes were associated with 2-hour recanalization, but patients with complete recanalization at 6 hours (43% of the patients) had a trend to have higher levels of FSAP-inhibitor complexes [109 (55-311) ng/mL vs. 46.5 (0-158) ng/mL; p=0.050] (Figure 1).

A cut-off point of FSAP antigen of 8.9 ug/mL was found to have 65.2% sensitivity and 62.1% specificity in the prediction of 2-hour recanalization. Table 1 shows the results of the univariate analysis. In logistic regression analysis, OCSF (TACI vs. others) was the only clinical independent predictor against complete recanalization at 2 hours [OR=0.33 (0.13-0.82), p=0.017] after adjustment by age, sex and NIHSS. Variables included on the first step of the logistic regression model were OCSF, proximal occlusion and coronary disease. When FSAP antigen levels under 8.9 ug/mL were added into the model, it was independently associated with 2-hour complete

recanalization [OR=3.22 (1.22-8.47), p=0.018]. The addition of FSAP antigen to the clinical model resulted in improved discrimination [IDI= 5.5% (1.4-9.7), p=0.009] (Figure 2). Moreover, the addition of FSAP antigen to the clinical model improved its accuracy [AUC from 0.656 (0.536-0.775) to 0.716 (0.609-0.823), p=0.016].

### FSAP and outcome

In the whole cohort, neurological improvement was observed at 48 hours in 52.7% and neurological worsening in 14.3%. Data for functional outcome 90 days after stroke were available for 100 patients, having 58 (58%) of them a mRS>2 (median mRS 3 [1-5]). Higher baseline FSAP antigen plasma levels were correlated with all outcome variables (Table 2, Figure 3), with significantly worsen outcomes in patients with higher levels. There were no relevant associations with outcome for the other FSAP measurements.



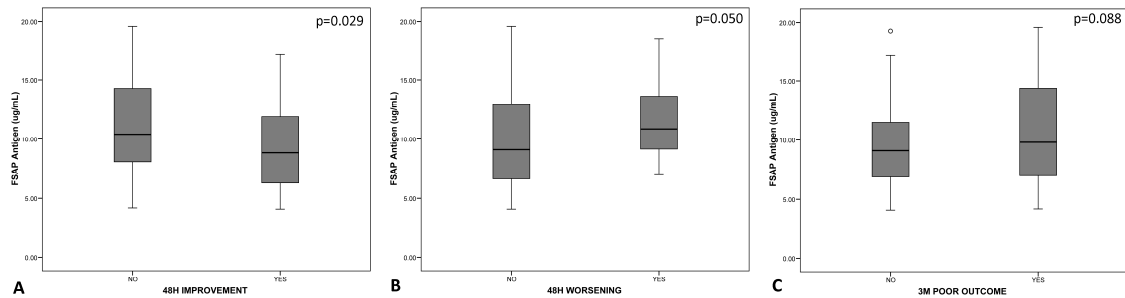
**Figure 2:** Comparison between predictive models with and without FSAP antigen levels. Light bars represent the predictive probabilities for complete recanalization at 2 hours when only clinical variables are considered (OCSF, age, sex and baseline NIHSS), and grey bars represent the predictive probabilities when FSAP antigen levels <8.9 ug/mL are added to the previous model. Integrated discrimination improvement (IDI) index results from the differences in events and no-events between both models (5.5% (1.4-9.7), p=0.009).

## DISCUSSION

Our study showed that recanalization after intravenous tPA treatment in acute stroke patients could be predicted by combining clinical and biochemical information. In fact, pre-treatment FSAP antigen was associated with higher recanalization rates at 2 hours when levels were below 8.9 ug/mL, and the addition of FSAP to the clinical model predicting recanalization resulted in improved accuracy and discrimination between events and no-events. However, these results represent preliminary data and will require validation. We consider the second finding stronger than an additional accuracy, as the C-statistic does not adequately represent whether a biomarker adds or not predictive value over clinical models [16].

Several studies have suggested that FSAP may have a role in stroke pathophysiology. The Marburg I SNP in the HAP2 gene has been implicated as a risk factor for coronary heart disease [17] and late complications of carotid stenosis [8]. Furthermore, in acute stroke patients, Hanson et al. recently observed increased FSAP antigen and activity levels, irrespectively of the underlying cause [10]. In the

present study, we demonstrate that recanalization after intravenous tPA treatment in acute stroke patients could be predicted by combining clinical and biochemical information. Pre-treatment FSAP antigen levels were associated with higher recanalization rates at 2 hours when those levels were below a cut-off point of 8.9 ug/mL.



**Figure 3:** Differences in FSAP antigen levels regarding outcome measures, neurological improvement at 48 hours (A), neurological worsening at 48 hours (B) and poor outcome at 3 months (C). Boxplots represent median and interquartile range (IQR) of FSAP antigen, expressed as ug/mL. Levels were compared by Mann-Whitney U test.

Using FSAP-knockout mice, Subramanian et al. have recently shown that the lack of endogenous FSAP impaired the formation of stable, occlusive thrombi, suggesting a pro-thrombotic effect of FSAP [17]. On the other hand, Joshi et al. observed that the lack of endogenous FSAP in FSAP-knockout mice resulted in an increased infarct volume and neurological impairment in a model of fibrin-induced middle cerebral artery occlusion. These effects seem to be mediated via the PI3K/AKT pathway with involvement of the protease activated receptor-1 [18]. Thus, in different compartments, FSAP has effects that are counterintuitive and it remains to be understood which effect is dominant.

Regarding the different measurements used in this study, correlation between FSAP antigen and activity in stroke patients have been reported [10]. However, in our cohort, although smaller than the previously reported, baseline FSAP antigen was neither correlated with FSAP activity nor with FSAP-inhibitor complexes, being the last 2 parameters correlated between them (data not shown). Also surprising is the fact that FSAP antigen levels were predictors of recanalization at earlier time-points, while FSAP-inhibitor complexes trended to predict recanalization at later time-points. We decided to focus on the antigen levels as early recanalization is the most interesting measure to indicate secondary reperfusion therapies.

Our study has some limitations. First, the reduced sample size could lead to underestimation of the effect of some previously described variables such as glycemia [19] in the prediction of recanalization, which could lead to suboptimal logistic regression models. Therefore, future studies with larger sample sizes would be needed to replicate our results. Second, we were not able to compare the predictive value of FSAP with other described markers of recanalization such as plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1) or alpha2-antiplasmin [20-21]. This issue could be of

importance, since a panel integrated by several biomarkers implicated in coagulation-fibrinolytic pathways could achieve better accuracy than a single biomarker, as the sensitivity and specificity of FSAP are not sufficient to support its use alone in clinical practice. Third, the selection of cut-off points of the biomarker levels depending on our own data could lead to an overestimation of the biomarker effect. However, no thresholds for FSAP antigen have been reported in the stroke literature and thus, our selected cut-off point could be of interest to be validated in future research. Fourth, the use of forward-stepwise logistic regression models could result in less robust conclusions. For this reason, we have repeated the analysis using 'Enter' method with similar results (data not shown). Fifth, the use of TCD to assess recanalization, although has been validated previously [13], is operator-dependent and requires some training. In the recent years, CT and MR-angiography have been increasingly used to assess reperfusion, and seems to be more powerful tools than TCD. Future studies should consider recanalization assessment by other techniques in order to minimize inter-observer variability and reach more accurate reperfusion measurements.

In conclusion, our preliminary data show that lower FSAP antigen levels were associated with a higher chance of arterial recanalization after tPA treatment, suggesting a deleterious role of FSAP in tPA-induced clot lysis, and this tPA response conditions stroke outcome. If these data were confirmed in future studies, FSAP antigen determination might be useful in predicting tPA response in stroke patients and could be explored as a therapeutic target for acute stroke management.

**CONFLICT OF INTEREST**

None.



## ACKNOWLEDGEMENTS

Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network INVICTUS (RD12/0014/0005) and is supported on stroke biomarkers research by FIS 11/0176. A.B. is supported by a Rio Hortega contract CM/00265 from the Instituto de Salud Carlos III. The authors would like to thank Kirsten Grundt for the FSAP measurements

## REFERENCES

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update. *Circulation*. 2015; 131: e29-e322.
2. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015; 372: 11-20.
3. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, et al. Thrombectomy within 8 Hours after Symptom Onset in Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2015; 372: 2296-2306.
4. Römisch J, Feussner A, Vermöhleu S, et al. A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999; 10: 471-9.
5. Kanse SM, Declerck PJ, Ruf W, et al. Factor VII activating protease promotes the proteolysis and inhibition of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 427-33
6. Kannemeier C, Al-Fakhri N, Preissner KT, et al. Factor VII activated protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. 2004; 18: 728-30
7. Roemisch J, Feusser A, Nerlich C, et al. The frequent Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of factor VII activating protease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002; 13: 433-441
8. Willeit J, Kiechl S, Weiner T, et al. Marburg I polymorphism of factor VII activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation*. 2007; 117: 667-670.
9. Trompet S, Pons D, Kanse SM, et al. Factor VII Activating Protease Polymorphism (G534E) Is Associated with Increased Risk for Stroke and Mortality. *Stroke Res Treat*. 2011: 424759.
10. Hanson E, Kanse SM, Joshi A, et al. Plasma factor VII-activating protease antigen levels and activity are increased in ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 848-856.
11. Brott TG, Haley EC Jr, Levy DE, et al. Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke*. 1992; 23: 632-640.
12. Demchuk AM, Tanne D, Hill MD, et al. Predictors of good outcome after intravenous tPA for acute ischemic stroke. *Neurology*. 2001; 57: 474-80.
13. Tsvigoulis G, Ribo M, Rubiera M, et al. Real-time validation of transcranial Doppler criteria in assessing recanalization during intra-arterial procedures for acute ischemic stroke: an international, multicenter study. *Stroke*. 2013; 44: 394-400.
14. Römisch J, Feussner A, Stöhr HA. Quantitation of the factor VII- and single-chain plasminogen activator-activating protease in plasmas of healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001; 12: 375-383.
15. Ireland H, Miller GJ, Webb KE, et al. The factor VII activating protease G511E (Marburg) variant and cardiovascular risk. *Thromb Haemost*. 2004; 92: 986-992.
16. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, et al. Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statist Med*. 2008; 27: 157-172.
17. Subramaniam S, Thielmann I, Morowski M, et al. Defective thrombus formation in mice lacking endogenous factor VII activating protease. *Thromb Haemost*. 2015; 113: 870-880.
18. Joshi AU, Orset C, Engelhardt B, et al. Deficiency of factor VII activating protease alters the outcome of ischemic stroke in mice. *Eur J Neurosci*. 2015; 41: 963-973.
19. Ribo M, Molina C, Montaner J, et al. Acute hyperglycemia state is associated with lower tPA-induced recanalization rates in stroke patients. *Stroke*. 2005; 36: 1705-1709.
20. Ribo M, Montaner J, Molina CA, et al. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 2004; 91: 1146-1151.
21. Martí-Fàbregas J, Borrell M, Cocho D, et al. Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA. *Neurology*. 2005; 65: 366-337.

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

## **4. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. UTILIDAD DE LA PREDICCIÓN DEL PRONÓSTICO EN EL ICTUS

Tradicionalmente, la predicción del pronóstico del ictus ha sido orientada desde un punto de vista global. Tener herramientas que nos den una información objetiva y fiable acerca de si nuestro paciente mejorará o empeorará en unas horas, morirá a corto o largo plazo o estará en situación funcional de autonomía o discapacidad unos meses después del ictus parece muy atractivo. Sin embargo, cuando pensamos en qué hacer como clínicos con esa información, las medidas que podemos adoptar son muy generales; informar al paciente o sus familiares, monitorizar o vigilar de forma más estrecha a un paciente que puede empeorar, retirar las medidas terapéuticas agresivas a los pacientes que probablemente mueran de todas formas en pocas horas; medidas oportunas y razonables que nos ayudarán a mejorar los cuidados, pero difícilmente se traducirán en una mejoría del pronóstico. Como ya comentamos en la introducción, los scores predictivos descritos para la predicción del pronóstico funcional o vital tras un ictus (revisados en el anexo 7.1 de la presente tesis doctoral), a pesar de cifras de precisión en muchos casos superiores al 80%, no son utilizados en la práctica clínica para la toma de decisiones.

Un cambio de mentalidad hacia la predicción, no del pronóstico global, sino de circunstancias en cierta medida prevenibles o modificables que puedan alterar el pronóstico final del ictus, por el contrario, puede resultar más eficaz, dado que una actuación directa destinada a la prevención o tratamiento precoz de esta complicación, capaz de evitarla o prevenir sus consecuencias, tendría un impacto en el pronóstico. Cuál sería la magnitud del impacto que pudiésemos conseguir es algo que debe ser respondido en futuros ensayos clínicos, aunque podría ser relevante si asumimos que el pronóstico final del ictus está determinado aproximadamente en un tercio por estos factores [Appelros P, 2003]. Parece razonable, por tanto, profundizar en el estudio del impacto de cada una de estas complicaciones sobre el pronóstico del ictus, para focalizar esfuerzos posteriores en aquellas que aparezcan como más importantes o explicativas.

Además, mucho se ha discutido acerca de si algunas de las complicaciones del ictus representan un factor de mal pronóstico en sí mismas o solo se comportan como marcadores de gravedad del ictus, como ha sido sugerido para las infecciones [Vargas M, 2006]. Esto resulta de especial interés al comprobar que, como comentamos en la introducción, la gravedad del ictus, probablemente el principal de los factores pronóstico, es también un predictor para muchos de estos factores, como la transformación hemorrágica (ver tabla 3 en la introducción), las complicaciones cardiológicas [Prosser J, 2007], o la neumonía asociada al ictus (ver tabla 4).

Respecto al uso de biomarcadores plasmáticos, como hemos comentado en el artículo 3.1 de la presente tesis doctoral refiriéndonos a los biomarcadores del sistema neuroendocrino, el hecho de demostrarse una asociación constante con el mal pronóstico no ha permitido su uso en clínica. Probablemente una de las razones sea la escasa investigación que se ha dedicado al estudio de la asociación entre biomarcadores plasmáticos y complicaciones específicas del ictus (ver tabla 1 del artículo 3.1). De hecho, de casi 40 estudios evaluando la asociación con el pronóstico general del ictus, solo 10 de ellos estudiaron además la asociación a alguna

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

complicación. Similares fueron los hallazgos en las revisiones sistemáticas de coceptina (tabla 2 del artículo 3.1), con un solo artículo de 10 que estudió infecciones y para IL-6 (artículo 3.2), donde de los 24 estudios finalmente incluidos en el metanálisis, solamente 8 estudiaron las infecciones asociadas al ictus, y otras complicaciones solo fueron reportadas en uno de ellos.

### 4.2. EVALUACIÓN DE LAS COMPLICACIONES DEL ICTUS EN NUESTRO MEDIO. IMPLICACIONES PARA EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES

En respuesta al primero de los objetivos del presente trabajo, en el artículo 3.3 de esta tesis doctoral hemos realizado el estudio de los factores con un mayor impacto sobre la mortalidad hospitalaria en un gran registro español de ictus. A diferencia de estudios anteriores similares, que han utilizado una metodología más convencional basada en el análisis de regresión logística con posterior cálculo de fracciones de riesgo atribuible para cada factor [Koennecke HC, 2011; Grube MM, 2013], en nuestro estudio hemos utilizado técnicas de machine-learning o aprendizaje automático, que presentan varias ventajas sobre otros tipo de análisis estadístico, siendo en general más apropiadas para el estudio de grandes conjuntos de datos. En concreto, las selvas aleatorias o random forest utilizados en este estudio suponen uno de los algoritmos de aprendizaje más precisos para grandes bases de datos, proporcionando además una estimación precisa de la importancia de cada variable, constituyendo uno de los modelos que proporcionan una mayor credibilidad [Breiman L, 2001].

A primera vista, puede parecer que los resultados del estudio, sin embargo no aportan nada novedoso, siendo muy similares a los descritos en el Berlin Stroke Register [Koennecke HC, 2011], identificándose el edema cerebral y las infecciones respiratorias como las complicaciones del ictus que presentan un mayor impacto sobre la mortalidad hospitalaria. Otras complicaciones como las cardiológicas, sin estar entre los principales factores, también presentaron un impacto sobre la mortalidad, especialmente en determinados subgrupos de pacientes. El propio diseño del estudio, mediante el uso de técnicas de machine-learning, así como los hallazgos del análisis estadístico constituyen los aspectos más originales del mismo. Con respecto a este último, aunque se comentará con más detalle más adelante al hablar de cada complicación, ha supuesto una sorpresa el hallazgo de un mayor impacto de las complicaciones en los pacientes con ictus más leves. Esta afirmación tiene sentido, ya que son los pacientes en que un desenlace fatal es menos esperable y donde la complicación supone un mayor cambio en el pronóstico, pese a ser los menos propensos a sufrirlas.

Una de las principales limitaciones del artículo 3.3 es que algunos factores importantes en el subgrupo de pacientes que son tratados mediante terapias de perfusión no son recogidos en el registro y, por tanto, su importancia no puede ser explorada. Nuestro grupo, a través del consorcio IBCD, condujo una encuesta entre neurólogos vasculares, cuya metodología y principales resultados se detallan en el anexo 7.2 de la presente tesis doctoral, y se encuentra disponible al completo en la página web [www.stroke-biomarkers.com](http://www.stroke-biomarkers.com). Esta encuesta encontró que la indicación más demandada por los neurólogos en la que el uso de biomarcadores sanguíneos podría ser de utilidad era el manejo de las terapias de perfusión, en el sentido de predecir la eficacia de las mismas (en términos de recanalización) y la seguridad (riesgo de transformación hemorrágica). Por esto, y a pesar de no ser identificada en el artículo 3.3, el

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

uso de biomarcadores para guiar las terapias de reperfusión también ha sido evaluado en la presente tesis.

### 4.3. ¿SON ÚTILES LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS PARA EL MANEJO DEL EDEMA CEREBRAL Y EL INFARTO MALIGNO DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA?

Como hemos comentado, el edema cerebral que se produce tras un ictus agudo puede resultar en un infarto maligno de la arteria cerebral media, condición que conlleva una alta mortalidad (en torno al 80% en ausencia de un tratamiento específico) y altas tasas de discapacidad entre los supervivientes [Treadwell SD, 2010]. Siendo así no es de extrañar que, a pesar de una baja incidencia, en nuestro estudio sea una de las complicaciones que conllevan un mayor impacto sobre la mortalidad hospitalaria. Estos datos están en línea con los del Berlin Stroke Register, que identificaron el edema cerebral con hipertensión intracraneal como la principal complicación en relación con la mortalidad hospitalaria en aquellos pacientes con estancias hospitalarias menores de una semana [Koennecke HC, 2011]. En el artículo 3.3 de la presente tesis doctoral, además, identificamos que en aquellos pacientes con menor gravedad inicial del ictus, el impacto de desarrollar esta complicación es aún mayor.

Con respecto al uso de biomarcadores para el manejo de esta complicación, en la literatura se ha descrito la asociación de los niveles de proteína glial S100B o fibronectina celular [Foerch C, 2004; Serena J, 2005] en plasma y el desarrollo de esta temida complicación. No obstante, su potencia es bastante menor que la de la resonancia magnética con secuencia de difusión, que constituye un biomarcador sensible y específico para la predicción del infarto maligno de la ACM y que es ampliamente usado hoy en día a nivel asistencial, habiéndose convertido en 'standard of care' [Wartenberg KE, 2012]. En este contexto, parece difícil que el uso de biomarcadores plasmáticos pueda aportar algo más sobre la resonancia magnética, sobre todo teniendo en cuenta que la decisión que se debe tomar es la realización de una cirugía agresiva como es la hemicraniectomía, y aquí un resultado falsamente positivo o negativo del biomarcador tendría un impacto sobre el paciente. No obstante, tampoco la lesión en difusión alcanza precisión del 100%, ya que un volumen mayor de 145 cc a las 14 horas, a pesar de una sensibilidad del 100% alcanza una especificidad del 94%, mientras que en fases más precoces (primeras 6 horas), un volumen mayor de 82 cc, aunque alcanza un 98% de especificidad, pierde sensibilidad hasta un 52% [Oppenheim, 2000; Thomalla, 2010].

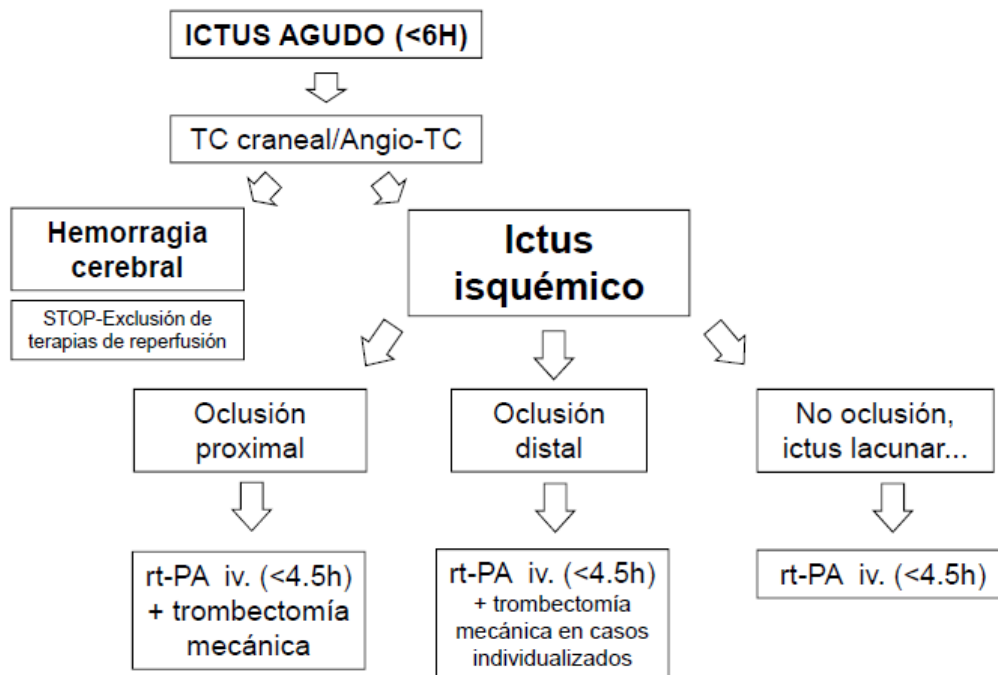
### 4.4. MANEJO DE LAS TERAPIAS DE REPERFUSIÓN MEDIANTE BIOMARCADORES SANGUÍNEOS

El activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA) intravenoso ha constituido el único tratamiento disponible para el ictus agudo durante muchos años [The NINDS tPA study group, 1995; Hacke W, 2008], aunque recientemente las terapias de reperfusión endovasculares han demostrado su eficacia en pacientes seleccionados con oclusión proximal de una arterial intracraneal [Berkhemer OA, 2015; Goyal M, 2015; Campbell BC, 2015; Jovin TG, 2015]. Sin embargo, estas terapias son costosas y no están disponibles en todos los centros, requiriendo muchas veces del traslado del paciente a centros dotados de la tecnología necesaria. También

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el tiempo que se requiere para la aplicación de estas terapias es mayor, puesto que los equipos capaces de administrar este tratamiento pueden no estar físicamente en el hospital, y se requiere de la preparación de una sala de angiografía. De forma general, el 'standard of care' de las terapias de reperfusión en la fase aguda del ictus podría ser resumido de la siguiente manera:

**Figura 6. 'Standard of care' de las terapias de reperfusión en el ictus agudo tras los ensayos clínicos de trombectomía endovascular**



Como se aprecia en el esquema, actualmente el algoritmo de decisión se basa exclusivamente en el tiempo transcurrido y en la existencia o no de una oclusión arterial. Sin embargo, la respuesta a estas terapias, como hemos comentado en la introducción, es muy variable, pues el rt-PA no siempre consigue la recanalización arterial [Saqqur M, 2007], el vaso una vez recanalizado puede volver a ocluirse [Alexandrov AV, 2002], o en el caso de las terapias de reperfusión, incluso habiendo conseguido una recanalización completa, en muchos pacientes esta no se acompañará de una mejoría del pronóstico, constituyendo lo que se ha dado en llamar recanalización fútil [Hussein HM, 2010]. Además, ambos tratamientos tienen el riesgo de provocar la temida transformación hemorrágica. Disponer de herramientas predictivas que nos diesen información sobre qué pacientes tienen un perfil de mala respuesta al rt-PA, o bien un alto riesgo de transformación hemorrágica, permitiría optimizar e individualizar el tratamiento de reperfusión. De hecho, en la encuesta del anexo 7.2 de la presente tesis doctoral podemos comprobar cómo el uso de biomarcadores en el manejo de las terapias de reperfusión resulta de gran interés para los neurólogos, siendo considerado útil por un 82% de los participantes en la encuesta y muy útil por un 42%.

De esta forma, en los trabajos 3.4 y 3.5 de la presente tesis doctoral hemos estudiado el papel de dos biomarcadores relativamente novedosos que actúan sobre el sistema hemostático y

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que se han visto recientemente alterados en el ictus agudo, como son la proteasa activadora del factor VII de la coagulación (FSAP) [Hanson E, 2012] o la proteasa de clivaje del factor de von Willebrand (A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13-ADAMTS13) [McCabe DJ, 2015; Qu L, 2016].

Aunque preliminares, los resultados de estos trabajos muestran que ambos biomarcadores podrían ser utilizados para predecir la respuesta al tratamiento con rt-PA intravenoso antes de ser administrado. De hecho, niveles plasmáticos elevados del antígeno de FSAP o actividades plasmáticas reducidas de ADAMTS13 demuestran no solo una asociación independiente con la respuesta vascular en términos de recanalización, sino incluso una mejoría de la precisión de dicha predicción, evaluada en términos de área bajo la curva ROC, y una mejoría en la discriminación evaluada por el IDI. Si estos resultados fuesen confirmados en muestras mayores, la medida de estos dos biomarcadores podría ser empleada en procesos de toma de decisiones. Por ejemplo, en un paciente atendido en un hospital que no dispone de medios para realizar un tratamiento endovascular que presentase niveles elevados de antígeno de FSAP o actividad plasmática reducida de ADAMTS13, dada la previsión de un mal resultado del tratamiento intravenoso, el traslado a un centro capaz de realizar una trombectomía debería ser inmediato, sin esperar una posible respuesta al rt-PA, mientras que ante la previsión de una respuesta favorable, podríamos esperar al tratamiento con tPA y así evitar traslados innecesarios.

De confirmarse en estudios más amplios, la combinación estos predictores de respuesta al rt-PA con biomarcadores de transformación hemorrágica descritos previamente por nuestro grupo [Montaner J, 2003; Hernández-Guillamón M, 2010; Merino-Zamorano C, 2015] nos permitirían adoptar una estrategia personalizada en el abordaje del ictus agudo mediante terapias de reperfusión, que podría mejorar el resultado de las mismas y, por tanto, el pronóstico de los pacientes candidatos a estas terapias. Sin embargo esta línea de investigación tiene una importante limitación y es que, con el nuevo 'standard of care' en el que los pacientes son tratados con terapias de reperfusión, la evaluación de la respuesta al rt-PA será mucho más difícil en futuros estudios, ya que no dispondremos de datos de recanalización en la misma manera en que los hemos recogido hasta ahora.

### 4.5. PAPEL DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN EL MANEJO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS AL ICTUS

Durante años se ha discutido si las complicaciones infecciosas del ictus suponen un factor independiente de mal pronóstico *per sé* o solo son un marcador de gravedad del ictus, como hemos comentado más arriba [Vargas M, 2006]. Nuestros resultados mostrados en el artículo 3.3 del presente trabajo sostienen firmemente que las infecciones respiratorias son uno de los principales factores predictores de mortalidad hospitalaria, encontrándose entre los factores con un mayor impacto en el random forest, mientras que para otras infecciones como las urinarias no se ha detectado este efecto.

Un sorprendente hallazgo en esta tesis doctoral es el hecho de que el impacto de sufrir una infección respiratoria es mucho mayor en aquellos pacientes con una menor gravedad del

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ictus. Este hecho parece razonable, pues en un paciente de edad avanzada con ictus grave, el hecho de sufrir una infección poco podrá cambiar el pronóstico, ya bastante desfavorable por las dos condiciones anteriores. Sin embargo este nuevo planteamiento podría suponer un cambio a la hora de seleccionar a los pacientes que podrían beneficiarse más de una antibioterapia profiláctica. Parece razonable que, en ausencia de una selección adecuada de los pacientes en los que una infección respiratoria tendrá un impacto sobre el pronóstico, una antibioterapia profiláctica, aun cuando sea capaz de reducir las infecciones, no tenga un impacto sobre el pronóstico, como hemos ido observando en los diferentes ensayos clínicos de antibioterapia profiláctica en ictus (Tabla 6). Gran parte de estos ensayos han utilizado como criterio de inclusión una mayor gravedad del ictus [Schwarz S, 2008; Harms H, 2008] con objeto de asegurar un porcentaje suficiente de infecciones y, por tanto, reducir el tamaño muestral.

**Tabla 6. Ensayos clínicos en antibioterapia profiláctica en pacientes con ictus. Actualizado de Salat D, et al. Med Clin (Barc) 2012**

ESTUDIO	PACIENTES	INTERVENCIÓN	TAMAÑO MUESTRAL	INFECCIÓN	NEUMONÍA	ESTADO FUNCIONAL	MORTALIDAD
ESPIAS [Chamorro A, 2005]	Ictus isquémico o hemorrágico	Levofloxacino vs. placebo	136	16% vs. 19% (p=NS)	-	OR=0.19 (0.04-0.87) favorable a placebo	24% vs. 13% (p=NS)
MISS [Schwarz S, 2008]	Ictus isquémico, encamado (mRS>3)	Mezlocilina-sulbactam vs. manejo convencional	60	50% vs. 90% (p<0.05)	16.7% vs. 23.3%	Shift favorable a tratamiento en mRS (p<0.05)	5.7% vs. 20% (valor de p no aportado)
PANTHERIS [Harms H, 2008] <sup>1</sup>	Ictus grave no lacunar (NIHSS>11)	Moxifloxacino vs. placebo	80	17.1% vs. 41.9% (p=0.032)	8.6% vs. 25.8% (p=0.097)	67% vs. 55% pronóstico favorable (IB≥60, p=NS)	15.4% vs. 17.5% (p=NS)
PASS [Westendorp, 2015]	Ictus isquémico o hemorrágico	Ceftriaxona vs. Placebo	2.550	OR=0.55 (0.44-0.70), p<0.0001	OR=0.80 (0.58-1.10), p=0.19	OR=0.95 (0.82-1.09), p=0.46	OR=0.96 (0.74-1.24), p=0.80
STROKE-INF [Kalra L, 2015]	Ictus isquémico o hemorrágico con disfagia	Antibiótico a elección del clínico vs. cuidados estándar	1.224	-	OR=1.21 (0.71-2.08), p=0.489	OR=0.87 (0.6-1.24), p=0.448	OR=1.22 (0.9-1.64), p=0.204

Los resultados están indicados como % de evento en el brazo de tratamiento vs. % de evento en el brazo placebo, o bien como odds ratio referida al tratamiento. NS= valor no significativo ( $\geq 0.05$ ); OR=odds ratio; mRS: escala de Rankin modificada; NIHSS: escala de ictus del National Institutes of Health; IB: índice de Barthel. <sup>1</sup>: Resultados referidos al análisis por protocolo

Sin embargo, los resultados de nuestro artículo 3.3 se posicionan en contra de esta línea de investigación. El hecho de seleccionar pacientes por variables clínicas relacionadas a su vez con el pronóstico del ictus y con el riesgo de desarrollar infecciones, como es la gravedad del ictus, puede ser el responsable de que, a pesar de que en casi todos los ensayos las tasas de infecciones han sido reducidas, esto no se ha traducido en una mejoría del pronóstico. Tampoco estudios que han prescindido del criterio de gravedad para la inclusión de pacientes han mostrado beneficio [Chamorro A, 2005; Westendorp, 2015], ni tampoco los que han seleccionado pacientes en riesgo de infección por otros factores asociados a esta, como la disfagia [Kalra L, 2015]. Estos resultados invitan a la búsqueda de nuevos factores que nos permitan identificar no sólo a los pacientes con un mayor riesgo de infección, sino a aquellos en los que ésta tendrá un mayor impacto.



## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este sentido, los biomarcadores plasmáticos podrían ayudarnos a identificar a los pacientes con un mayor riesgo a sufrir una infección. Así, en el artículo 3.2 de esta tesis doctoral, además de evaluar el valor pronóstico de la IL-6, pudimos evaluar en qué complicaciones del ictus había sido estudiada la asociación de este biomarcador con el pronóstico del ictus. Sorprendentemente, muy pocos artículos evaluaron la asociación de IL-6 a las complicaciones del ictus, teniendo solamente datos sobre infecciones ocho estudios, incluyendo 701 pacientes. Como se muestra en el artículo, IL-6 se asoció de forma independiente con el desarrollo de infecciones. Análisis adicionales no mostrados en la publicación (Anexo 7.3) nos ofrecieron más información al respecto, como que las diferencias entre pacientes con y sin infección no estaban presentes en las primeras horas tras el ictus, o que el valor predictivo adicional de la IL-6 sobre los predictores clínicos de infección era muy escaso o nulo (IDI=1.69%,  $p=0.063$ ). La mayor limitación de este estudio la constituyó el hecho de desconocer el momento de la infección, que nos impidió evaluar si la elevación de IL-6 se trataría de un epifenómeno de la infección o un predictor de la misma.

En este sentido, el artículo 3.6 de la presente tesis nos ofreció bastante más información. En un tamaño muestral similar (siete estudios incluyendo 699 pacientes), pudimos observar una asociación importante entre los niveles de CRP y la ocurrencia de infección tras el ictus, cuando ésta se medía después de las primeras 24 horas, comportándose además como un predictor independiente de los factores clínicos asociados al desarrollo de infección, incluso aportando valor adicional en términos de precisión y discriminación sobre ellos, aunque este fue escaso y posiblemente insuficiente como para ser utilizado en la práctica clínica. Pero quizás lo más interesante de este trabajo es que nos permitió identificar el mejor momento para realizar la medición, siendo este tras las primeras 24 horas del inicio del ictus, ya que en la fase más aguda las diferencias no estaban aún presentes, y para medidas posteriores, a pesar de ser mejor la predicción, muchos pacientes habían desarrollado ya la infección, con lo cual el uso de medidas seriadas parece lo más razonable.

Por otra parte, uno de los hechos más relevantes del estudio fue poder analizar el valor predictivo de CRP para predecir infección, pudiendo excluir a los pacientes con infecciones precoces, es decir, diagnosticadas antes de la medida de CRP. El hecho de comprobar que CRP aun dispone de un valor predictivo adicional en este subanálisis es de gran interés y abre el campo para el uso de los biomarcadores plasmáticos en esta indicación.

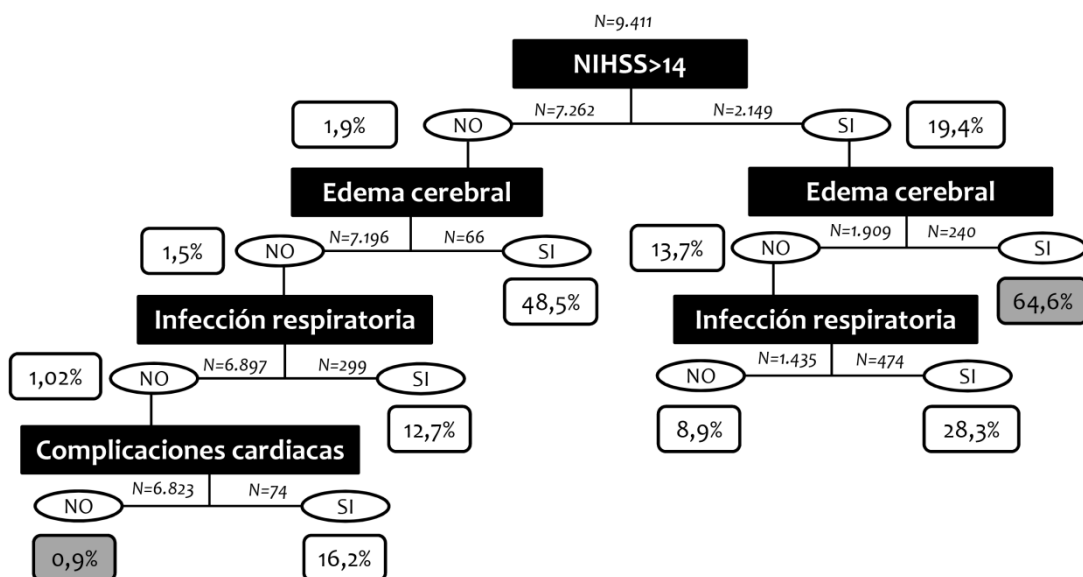
Probablemente la gran debilidad de ambos estudios sea la falta de especificidad de los biomarcadores, pues a fin de cuentas se trata de reactantes de fase aguda que pueden estar elevados por el propio ictus, en ausencia de infección. En este sentido, su combinación en un panel con nuevos biomarcadores capaces de mejorar la especificidad sería de gran interés. Pero finalmente, para que todo esto sirva de algo, el objetivo a demostrar sería que el manejo basado en biomarcadores se traduce en un impacto sobre el pronóstico del paciente con respecto al manejo convencional, con un diseño similar al que el estudio STRAWINSKI está realizando con el biomarcador procalcitonina [Ulm L, 2013].

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.6. PAPEL DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN EL MANEJO DE LAS COMPLICACIONES CARDIACAS DEL ICTUS

Las complicaciones cardíacas del ictus, definidas como insuficiencia cardíaca aguda (o edema agudo de pulmón) o síndrome coronario agudo no han aparecido entre las principales complicaciones con un mayor impacto sobre la mortalidad hospitalaria en nuestro medio, según lo expuesto en el artículo 3.3. Una baja incidencia de complicaciones cardíacas, menor que lo esperado según la literatura [Prosser J, 2007] puede ser la responsable de estos hallazgos. Sin embargo, sí que aparecieron por delante de factores tradicionalmente asociados al pronóstico como la diabetes, la fibrilación auricular o la discapacidad previa. De forma específica, algunos de los árboles de clasificación y regresión (CARTs) mostraron que las complicaciones cardiológicas podrían tener importancia en pacientes determinados, como pueden ser aquellos con una menor gravedad del ictus y que no sufren de otras complicaciones, como muestra la siguiente figura.

**Figura 7. Ejemplo de árbol de clasificación de los utilizados en el artículo 3.3 de la presente tesis doctoral**



Los cuadros negros representan las variables que dividen el conjunto de datos mientras que los cuadros blancos representan el porcentaje de mortalidad predicho en cada uno de los nodos. El tamaño muestral en cada división se muestra igualmente. Los nodos con el mayor y menor porcentaje de predicción de mortalidad están marcados en gris.

Como mostramos en la tabla 5 de la introducción, la investigación en biomarcadores en relación con las complicaciones cardíacas del ictus ha sido muy escasa, a pesar del uso diario que se hace de los biomarcadores sanguíneos en el campo de la cardiología. Desde hace muchos años es conocido que en el contexto del ictus agudo, muchos pacientes presentan niveles elevados de troponina (Tn). Este porcentaje se ha cifrado tradicionalmente en torno a un 35% [Christensen H, 2004], aunque con el uso de los nuevos ensayos ultrasensibles este porcentaje puede ser aún mayor. Diversos estudios han propuesto que esta elevación puede

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

asociarse con un aumento de la mortalidad hospitalaria y una peor situación funcional [Kerr G, 2009]. A pesar de no conocerse exactamente el significado de esta elevación, las guías de práctica clínica de la Asociación Americana del Corazón (AHA) recomiendan la determinación de Tn en los pacientes con ictus, aunque no se dan claras instrucciones acerca de qué hacer con un paciente con una elevación de Tn [Jauch EC, 2013].

Los resultados de nuestro artículo 3.7 suponen un aspecto novedoso, ya que establecen un posible mecanismo acerca de la asociación de una sola medida basal de troponina-I ultrasensible (hs-TnI) con las complicaciones cardiacas del ictus. Estos resultados son preliminares y deben ser confirmados en estudios mayores, quizás utilizando muestras seriadas, pues se ha establecido también que el patrón estático de elevación de Tn tras el ictus no tiene consecuencias sobre el pronóstico, a diferencia del patrón dinámico [Sanders B, 2013]. De todas formas, de acuerdo con nuestros resultados, que indican que una sola determinación basal de hs-TnI en pacientes con ictus isquémico agudo es predictiva de la ocurrencia de complicaciones cardiacas, aportando además valor adicional sobre los factores clínicos, la medida de hs-TnI podría ser utilizada para la identificación precoz de estos pacientes, que podrían ser vigilados de forma más estrecha, monitorizados durante más tiempo, o sometidos a un estudio cardiológico más extenso.

### 4.7. PRÓXIMOS PASOS:

La presente tesis doctoral sienta las bases para el estudio de biomarcadores plasmáticos para la predicción y el manejo de las complicaciones del ictus en la fase subaguda, ya que hemos identificado cuáles son las principales complicaciones que tienen un mayor impacto sobre la mortalidad hospitalaria del ictus, además de identificar subgrupos de pacientes en los que la ocurrencia de estas complicaciones tiene un efecto más perjudicial. También hemos propuesto interesantes candidatos para la predicción de estas, siendo algunos de ellos biomarcadores clásicos puestos a punto en la mayoría de los hospitales, como CRP o hs-TnI, pero también candidatos novedosos como FSAP o ADAMTS13. Sin embargo, no podemos decir que ninguno de los biomarcadores que hemos descrito en esta tesis doctoral esté listo para dar el salto translacional a la práctica clínica. Los siguientes puntos definen algunos puntos que serían necesarios para llegar a esta meta.

#### 4.7.1. Grandes estudios prospectivos multicéntricos

La realización de grandes estudios prospectivos, multicéntricos, en el campo de los biomarcadores sanguíneos supone un reto, ya que requiere una inversión considerable. No obstante y como hemos venido detectando en los artículos de revisión de la presente tesis doctoral (artículos 3.2 y anexo 7.1), en general los estudios de biomarcadores en ictus tienen carácter unicéntrico y tamaños muestrales reducidos. Todo esto limita la generalización de conclusiones a otras poblaciones, además de implicar un alto riesgo de error de tipo II y generar, por tanto resultados falsamente positivos. Llama la atención que, en todos los metanálisis realizados en la presente tesis doctoral (artículos 3.1, 3.2 y 3.6) uno de los puntos más deficientes del cuestionario de calidad sea el no calcular previamente el tamaño muestral necesario.

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años se han llevado a cabo algunos grandes estudios de biomarcadores, de carácter uni- o multicéntrico, lo cual ha permitido generar conclusiones robustas sobre estos biomarcadores [Montaner J, 2011; De Marchis GM, 2013]. En los próximos años, la realización de estos estudios de carácter multicéntrico debería ser la norma, para lo cual el apoyo de varios grupos trabajando en consorcios, como sería el caso del ‘International Biomarkers in Cerebrovascular Diseases (IBCD) study group’ (<http://stroke-biomarkers.com/page.php?title=Network>), será de gran ayuda.

Un importante factor a la hora de realizar estos estudios es la unificación de las definiciones de las distintas complicaciones. Para el caso de las infecciones respiratorias, que como hemos podido ver en nuestro artículo 3.6 son definidas de forma muy variable, resultaría de especial interés seguir las definiciones planteadas recientemente por el grupo ‘Pneumonia In Stroke Consensus Group (PISCES)’ [Smith CJ, 2015 (2)].

### 4.7.2. Estudios semi-intervencionales y ensayos clínicos basados en biomarcadores

Tras la replicación en grandes poblaciones, el siguiente paso a la hora de implementar un biomarcador en la práctica clínica sería, idealmente, demostrar que su inclusión en un esquema de decisión mejora realmente el pronóstico de los pacientes con respecto al manejo convencional, sin el uso del biomarcador. Como ya hemos comentado, el estudio STRAWINSKI está actualmente siguiendo un diseño similar, comparando el pronóstico funcional de dos cohortes de pacientes que difieren en el manejo de la antibioterapia para las infecciones asociadas al ictus, realizándose este de acuerdo a la práctica clínica habitual en el brazo ‘placebo’, mientras que en el otro la indicación de antibioterapia viene dada por la elevación de procalcitonina, aconsejándose al médico responsable del paciente iniciar tratamiento antibiótico si los niveles superan un determinado punto de corte [Ulm L, 2013]. Además de las infecciones, este diseño de estudio podría ser apropiado para evaluar el impacto del uso de biomarcadores en otras indicaciones, como las terapias de reperfusión.

Por otra parte, no solo la mejoría del pronóstico de los pacientes debe ser objeto de estudio, sino que la relación coste-eficacia de la aplicación de una determinada medida debe ser evaluada. De hecho, aunque la situación ideal sería encontrar medidas que mejoran el pronóstico y reducen el gasto sanitario con respecto al ‘standard of care’, un cambio en el proceso asistencial que no suponga una mejoría significativa en el pronóstico de los pacientes, pero sí en una reducción del coste sanitario asociado al proceso, podría ser también de gran interés.

### 4.7.3. Descubrimiento de nuevos biomarcadores sanguíneos. Papel de las “-ómicas”

Los biomarcadores determinados en los artículos que componen esta tesis doctoral han sido seleccionados como candidatos por función. Aunque lógico desde un punto de vista fisiopatológico, ya que existe generalmente una relación conocida entre el biomarcador y la ocurrencia del evento que queremos predecir, la elección de candidatos por función puede suponer un sesgo de selección, ya que dejamos en el tintero posibles candidatos mejores por

## SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

desconocimiento de los mismos o de su nexa fisiopatológico con nuestro evento de interés [Martínez-Morillo E, 2014].

La identificación de nuevos biomarcadores capaces de complementar o de mejorar a aquellos de que disponemos pasa por el descubrimiento de nuevos candidatos. En los últimos años ha surgido un interés reciente por las -ómicas, técnicas de alto rendimiento capaces de realizar un amplio screening de moléculas diferentes. En el campo de los biomarcadores, son interesantes las librerías de anticuerpos [García-Berrocso T, 2014] o los estudios de proteómica por espectrometría de masas [Ning MM, 2012], que permiten explorar una gran cantidad de proteínas y seleccionar las diferentemente expresadas entre dos condiciones diferentes. Hasta hoy, según nuestro conocimiento, este tipo de aproximación no ha sido utilizado para la identificación de biomarcadores relacionados con las complicaciones del ictus, y sería por tanto interesante llevarlas a cabo en los próximos años. Sin embargo, estas técnicas también tienen sus limitaciones, ya que el uso de comparaciones múltiples genera un número considerable de falsos positivos, no existiendo consenso en cuanto a qué correcciones estadísticas deben aplicarse para evitarlos [Abu-Asab MS, 2011; Mellick GD, 2010].

Hace unos años nos acercábamos a la cabecera de nuestros pacientes con ictus armados tan solo con martillo y estetoscopio. Más recientemente añadimos a nuestro arsenal herramientas tan útiles como la ultrasonografía y las técnicas de neuroimagen. En los próximos años, esperamos que el uso de biomarcadores sanguíneos pueda ser incorporado a la toma de decisiones, complementando a las herramientas de que disponemos actualmente y ayudándonos a seguir mejorando el pronóstico del ictus.

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

## **5. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son:

1. Junto a la edad y la gravedad del ictus, las complicaciones que han demostrado un mayor impacto sobre el pronóstico, en términos de mortalidad hospitalaria, son el edema cerebral y las infecciones respiratorias, siendo el efecto de estas complicaciones especialmente perjudicial en pacientes con ictus menos graves.
2. La indicación más demandada de los biomarcadores sanguíneos por los neurólogos vasculares es el manejo de las terapias de reperfusión.
3. El uso de biomarcadores sanguíneos para la predicción de las complicaciones asociadas a mal pronóstico en el ictus no ha sido explorado suficientemente en la literatura.
4. El empleo de biomarcadores sanguíneos no parece tener un claro papel en el manejo del edema cerebral maligno.
5. La proteasa activadora del factor VII de coagulación (FSAP) y la proteasa de clivaje del factor de Von Willebrand (ADAMTS13) predicen la respuesta al tratamiento trombolítico endovenoso mejorando la predicción que puede realizarse con variables clínicas, y por tanto podrían ser utilizadas para seleccionar precozmente candidatos a terapias endovasculares.
6. Niveles elevados de proteína C-reactiva se asocian de forma significativa a la ocurrencia de infecciones asociadas al ictus, siendo su elevación a partir de las primeras 24 horas predictora del desarrollo de las mismas.
7. Niveles basales elevados de troponina I ultrasensible predicen la ocurrencia de complicaciones cardíacas.
8. Futuros estudios deben establecer si el uso de estos biomarcadores, solos o combinados con otros candidatos en un panel, en las indicaciones mencionadas, resultan en una mejoría del pronóstico de los pacientes y/o una reducción del gasto sanitario.

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

## **6. REFERENCIAS**



## A

Abu-Asab MS, Chaouchi M, Alesci S, Galli S, Laassri M, Cheema AK, et al. Biomarkers in the age of omics: time for a systems biology approach. *OMICS* 2011; 15: 105-112

Adams RJ, Chimowitz MI, Alpert JS, Awad IA, Cerqueria MD, Fayad P, et al. Coronary risk evaluation in patients with transient ischemic attack and ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the stroke council and the council on clinical cardiology of the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2003; 34: 2310-2322

Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 2002; 59: 862-867

Alvarez-Sabín J, Montaner J, Padró L, Molina CA, Rovira R, Codina A, et al. Gabapentin in late-onset poststroke seizures. *Neurology*. 2002; 59: 1991-1993

Alvarez-Sabín J, Ortega G, Jacas C, Santamarina E, Maisterra O, Ribo M, et al. Long term treatment with citicolina may improve post stroke vascular cognitive impairment. *Cerebrovasc Dis*. 2013; 35: 146-154

Andersen G, Vestergaard K, Ingeman-Nielsen M, Jensen TS. Incidence of central post-stroke pain. *Pain* 1995; 61: 187-193

Ankolekar S, Renton C, Sare G, Ellender S, Sprigg N, Wardlaw JM, et al, ENOS Trial Investigators. Relationship between post stroke cognition, baseline factors, and functional outcome: data from "efficacy of nitric oxide in stroke" trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014; 23: 1821-1829

Appelros P, Nydevik I, Viitanen M. Poor outcome after first-ever stroke: predictors for death, dependency, and recurrent stroke within the first year. *Stroke*. 2003; 34: 122-126

Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabín J; por el comité ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos. En: Diez E, ed. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus, no 3. Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología (SEN). Barcelona: Prous Science, 2006

Arenillas JF, Candell-Riera J, Romero-Farina G, Molina CA, Chacón P, Aguadé-Bruix S, et al. Silent myocardial ischemia in patients with symptomatic intracranial atherosclerosis: associated factors. *Stroke*. 2005; 36: 1201-1206

Ay H, Gunger L, Arsava EM, Rosand J, Vangel M, Benner T, et al. A score to predict early risk of recurrence after ischemic stroke. *Neurology*. 2010; 74: 128-135

Ayerbe L, Ayis S, Wolfe CD, Rudd AG. Natural history, predictors and outcomes of depression after stroke: systematic review and meta-analysis. *BJP*. 2013; 202: 14-21

Ayerbe L, Ayis S, Crichton S, Wolfe CD, Rudd AG. The long-term outcomes of depression up to 10 years after stroke; the South London rStroke Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85: 514-521

## B

Balami JS, Chen RL, Grunwald IQ, Buchan AM. Neurological complications of acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2011; 10: 357-371

Beghi E, D'Alessandro R, Beretta S, Consoli D, Crespi V, Delaj L, et al. Incidence and predictors of acute symptomatic seizures after stroke. *Neurology*. 2011; 77: 1785-1793

Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. MR CLEAN Investigators. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015; 372: 11-20

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

Bladin C, Alexandrov A, Bellavance A, Bornstein N, Chambers B, Coté R, et al. Seizures after stroke: a prospective multicenter study. *Arch Neurol.* 2000; 57: 1617-1628

Brandstater ME, Roth EJ, Siebens HC. Venous thromboembolism in stroke: literature review and implications for clinical practice. *Arch Phys Med Rehabil.* 1992; 73: S379-391

Breiman L. Random Forests. *Machine Learning.* 2001; 45: 5-32

Brott T, Adams Jr HP, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke.* 1989; 20: 864-870

Brott TG, Haley Jr EC, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, et al. Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke.* 1992; 23: 632-640

Burn J, Dennis M, Bamford J, Sandercock P, Wade D, Warlow C. Long-term risk of recurrent stroke after a first-ever stroke: the oxfordshire community stroke project. *Stroke.* 1994; 25: 333-337

Burneo JG, Fang J, Saposnik G. investigators of the registry of the Canadian Stroke Network impact of seizures on morbidity and mortality after stroke: a Canadian multi-centre cohort study. *Eur J Neurol.* 2010; 17: 52-58

Bustamante A, Dominguez C, Rodriguez-Sureda V, Vilches A, Penalba A, Giralt D, et al. Prognostic value of plasma chitotriosidase activity in acute stroke patients. *Int J Stroke.* 2014; 9: 910-916

Bustamante A, Garcia-Berrococo T, Llobart V, Simats A, Giralt D, Montaner J. Neuroendocrine hormones as prognostic biomarkers in the setting of acute stroke: overcoming the major hurdles. *Expert Rev Neurother.* 2014; 14: 1391-1403 (2)

Bustamante A, García-Berrococo T, Rodriguez N, Llobart 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.* 2015 Dec 23. [Epub ahead of print]

Bybee KA, Kara T, Prasad A. Systematic review: transient left ventricular apical ballooning: a syndrome that mimics ST segment elevation myocardial infarction. *Ann Intern Med.* 2004; 141: 858-865

## C

Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. EXTEND-IA Investigators. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1009-1018

Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, Dávalos A. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2004; 35: 1671-1676

Choi KH, Park MS, Kim JT, Nam TS, Choi SM, Kim BC, et al. The serum ferritin level is an important predictor of hemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol.* 2012; 19: 570-577

Choi-Kwon S, Han SW, Kwon SU, Kim JS. Poststroke fatigue: characteristics and related factors. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 19: 84-90

Chamorro A, Horcajada JP, Obach V, Vargas M, Revilla M, Torres F, et al. The Early Systemic Prophylaxis of Infection After Stroke study: a randomized clinical trial. *Stroke.* 2005; 36: 1495-1500

Christensen H, Johannesen HH, Christensen AF, Bendtzen K, Boysen G. Serum cardiac Troponin I in acute stroke is related to serum cortisol and TNF Alpha. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 18: 184-199

Chumbler NR, Williams LS, Wells CK, Lo AC, Nadeau S, Peixoto AJ, et al. Derivation and validation of a clinical system for predicting pneumonia in acute stroke. *Neuroepidemiology*. 2010; 34: 193-199

Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy (ILAE). Proposal for revised clinical end electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981; 22: 489-501

Cuadrado E, Rosell A, Colomé N, Hernández-Guillamon M, García-Berrocso T, Ribo M, et al. The proteome of human brain after ischemic stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69: 1105-1115

Cucchiara B, Tanne D, Levine SR, Demchuk AM, Kasner S. A risk score to predict intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2008; 17: 331-333

## D

Daniele O, Caravaglios G, Fierro B, Natale E. Stroke and cardiac arrhythmias. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2002; 11: 28-33

Dayon L, Turck N, García-Berrocso T, Walter N, Burkhard PR, Vilalta A, et al. Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteome Res*. 2011; 10: 1043-1451

De Marchis GM, Katan M, Weck A, et al. Copeptin adds prognostic information after ischemic stroke. Results from the CoRisk study. *Neurology*. 2013; 80: 1278-1286

Dennis M, Sandercock P, Reid J, Graham C, Forbes J, et al; CLOTS (Clots in Legs Or sTockings after Stroke) Trials Collaboration. Effectiveness of intermittent pneumatic compression in reduction of risk of deep vein thrombosis in patients who have had a stroke (CLOTS 3): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2013; 382: 516-524

Douiri A, McKeivitt C, Emmett ES, Rudd AG, Wolfe CD. Long-term effects of secondary prevention on cognitive function in stroke patients. *Circulation*. 2013; 128: 1341-1348

## E

European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*. 2008; 25: 457-507

## F

Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, Murray CJ, Roth GA; GBD 2013 Stroke Panel Experts Group. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology*. 2015; 45: 230-236

Fick DM, Agostini JV, Inouye SK. Delirium superimposed on dementia: a systematic review. *J Am Geriatr Soc*. 2002; 50: 1723-1732

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

Foerch C, du Mesnil de Rochemont R, Singer O, Neumann-Haefelin T, Buchkremer M, Zanella FE, et al. S100B as a surrogate marker for successful clot lysis in hyperacute middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003; 74: 322-325

Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, et al. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2004; 35: 2160-21642

Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77: 181-184

Foerch C, Wunderlich MT, Dvorak F, Humpich M, Kahles T, Goertler M, et al. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke*. 2007; 38: 2491-2495

## G

García-Berrococo T, Giralt D, Bustamante A, Etgen T, Jensen JK, Sharma JC, et al. B-type natriuretic peptides and mortality after stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2013; 81: 1976-1985

García-Berrococo T, Giralt D, Bustamante A, Llombart V, Rubiera M, Penalba A, et al. Role of beta-defensin 2 and interleukin-4 receptor as stroke outcome biomarkers. *J Neurochem*. 2014; 129: 463-472

Gillespie DC, Bowen A, Chung CS, Cockburn J, Knapp P, Pollock A. Rehabilitation for post-stroke cognitive impairment: an overview of recommendations arising from systematic reviews of current evidence. *Clin Rehabil*. 2015; 29: 120-128

Gold AB, Herrmann N, Swardfager W, Black SE, Aviv RI, Tennen G, et al. The relationship between indoleamine 2, 3-dioxygenase activity and post-stroke cognitive impairment. *J Neuroinflammation*. 2011; 8: 17

Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. American Heart Association Stroke Council, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke*. 2011; 42: 2672-2713

Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. ESCAPE Trial Investigators. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015; 372: 1019-1030

Gray V, Rice CL, Garland SJ. Factors that influence muscle weakness following stroke and their clinical implications: a critical review. *Physiother Can*. 2012; 64: 415-426

Grube MM, Koennecke HC, Walter G, Meisel A, Sobesky J, Nolte CH, et al. Influence of acute complications on outcome 3 months after ischemic stroke. *PLoS One*. 2013; 24; e75719

## H

Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R. 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol*. 1996; 53: 309-315

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, et al. Randomized double blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 1998; 352: 1245-1251

Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA Stroke trials. *Lancet*. 2004; 363; 768-774

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1317-1329

Hackett ML, Yapa C, Parag V, Anderson CS. Frequency of depression after stroke: a systematic review of observational studies. *Stroke*. 2005; 36: 1330-1340

Hanson E, Kanse SM, Joshi A, et al. Plasma factor VII-activating protease antigen levels and activity are increased in ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 848-856

Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C et al. Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One*. 2008; 3, e2158

Harms H, Grittner U, Dröge H, Meisel A. Predicting post-stroke pneumonia: the PANTHERIS score. *Acta Neurol Scand*. 2013; 128: 178-184

Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ*. 1976; 54: 541-553

Hauser WA. Seizure disorders. *Epilepsia*. 1992; 33: S6-S14

Heiss WD. Malignant MCA Infarction: Pathophysiology and Imaging for Early Diagnosis and Management Decisions. *Cerebrovasc Dis*. 2016; 41: 1-7

Hernández-Guillamón M, Garcia-Bonilla L, Solé M, Sosti V, Parés M, Campos M, et al. Plasma VAP-1/SSAO activity predicts intracranial hemorrhages and adverse neurological outcome after tissue plasminogen activator treatment in stroke. *Stroke*. 2010; 41: 1528-1535

Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Janzen RW, et al. Predictors of in-hospital mortality and attributable risks of death after ischemic stroke: the German Stroke Registers Study Group. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1761-1768

Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, Rastenyte D, Ryglewicz D, Sarti C, et al; European Registers of Stroke (EROS) Investigators. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke*. 2009; 40: 1557-1563

Hoffmann S, Malzahn U, Harms H, Koennecke HC, Berger K, Kalic M, et al. Development of a clinical score (A2DS2) to predict pneumonia in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2012; 43: 2617-2623

Hossmann KA: Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26: 1057-1083

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: 416-422

Hussein HM, Georgiadis AL, Vazquez G, Miley JT, Memon MZ, Mohammad YM, et al. Occurrence and predictors of futile recanalization following endovascular treatment among patients with acute ischemic stroke: a multicenter study. *Am J Neuroradiol*. 2010; 31: 454-458

## I

Ingles JL, Eskes GA, Phillips SJ. Fatigue after stroke. *Arch Phys Med Rehabil*. 1999; 80: 173-178

Instituto Nacional de Estadística. Salud. España en cifras 2015. Madrid: INE; 2015: 18.

## J

Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013; 44: 870-947

Ji R, Shen H, Pan Y, Wang P, Liu G, Wang Y, et al. China National Stroke Registry Investigators. Novel risk score to predict pneumonia after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2013; 44: 1303-1309

Jiménez I, Sobrino T, Rodríguez-Yáñez M, Pouso M, Cristobo I, Sabucedo M, et al. High serum levels of leptin are associated with post-stroke depression. *Psychol Med*. 2009; 39: 1201-1209

Johnston SC, Mendis S, Mathers CD. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modeling. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 345-354

Jonsson AC, Lindgren I, Hallstrom B, Norrving B, Lindgren A. Prevalence and intensity of pain after stroke: a population based study focusing on patients' perspectives. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77: 590-595

Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A. REVASCAT trial investigators. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372: 2296-2306

## K

Kalra L, Irshad S, Hodsoll J, Simpson M, Gulliford M, Smithard D, et al; on behalf of the STROKE-INF Investigators. 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: 1835-1844

Katan M, Elkind MSV. Inflammatory and neuroendocrine biomarkers of prognosis after ischemic stroke. *Expert Rev Neurother.* 2011; 11: 225-239

Katzan IL, Cebul RD, Husak SH, Dawson NV, Baker DW. The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke. *Neurology.* 2003; 60: 620-625

Katzan IL, Dawson NV, Thomas CL, Votruba ME, Cebul RD. The cost of pneumonia after acute stroke. *Neurology.* 2007; 68: 1938-1943

Kelly J, Hunt BJ, Lewis RR, Swaminathan R, Moody A, Seed PT, et al. Dehydration and venous thromboembolism after acute stroke. *Q JM.* 2004; 97: 293-296

Kelly J, Rudd A, Lewis RR, Coshall C, Moody A, Hunt BJ. Venous thromboembolism after acute ischemic stroke: a prospective study using magnetic resonance direct thrombus imaging. *Stroke* 2004; 35: 2320-2325 (2)

Kerr G, Ray G, Wu O, Stott DJ, Langhorne P. Elevated Troponin after Stroke: A Systematic Review. *Cerebrovasc Dis.* 2009; 28: 220-226

Khatri P, Wechsler LR, Broderick JP. Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke.* 2007; 38: 431-440

Klipper E, Bashat DB, Bornstein NM, Shenhar-Tsarfaty S, Halleivi H, Auriel E, et al. Cognitive decline after stroke: relation to inflammatory biomarkers and hippocampal volume. *Stroke.* 2013; 44: 1433-1435

Koennecke HC, Belz W, Berfelde D, Endres M, Fitzek S, Hamilton F, et al. Factors influencing in-hospital mortality and morbidity in patients treated on a stroke unit. *Neurology.* 2011; 77: 965-972

Kumar S, Selim MH, Caplan LR. Medical complications after stroke. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 105-118

Kwon HM, Jeong SW, Lee SH, Yoon BW. The pneumonia score: a simple grading scale for prediction of pneumonia after acute stroke. *Am J Infect Control* 2006; 34: 64-68

## L

Lansberg MG, Albers GW, Wijman CA. Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: a review of the risk factors. *Cerebrovasc Dis.* 2007; 24: 1-10

Li Y, Wang X, Yang Z. Neuron-specific enolase in patients with acute ischemic stroke and related dementia. *Chin Med J.* 1995; 108: 221-223

Liao J, O'Donnell MJ, Silver FL, Thiruchelvam D, Saposnik G, Fang J, et al. In-hospital myocardial infarction following acute ischaemic stroke: an observational study. *Eur J Neurol* 2009; 16: 1035-1340

Lindley R, Wardlaw JM, Sandercock PAG, Rimdusid P, Lewis SC, Signorini DF, et al. Frequency and risk factors for spontaneous hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2004; 13: 235-246

Lipowski Z. Delirium in geriatric patients. *Delirium: acute confusional states*. New York, NY: Oxford University Press; 1990.

Liu MD, Ning WD, Wang RC, Chen W, Yang Y, Lin Y, et al. Low-dose versus standard-dose tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke in Asian populations: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94: e2412

Llombart V, Dominguez C, Bustamante A, Rodriguez-Sureda V, Martín-Gallán P, Vilches A, et al. Fluorescent molecular peroxidation products: a prognostic biomarker of early neurologic deterioration after thrombolysis. *Stroke*. 2014; 45: 432-437

Llombart V, Antolin-Fontes A, Bustamante A, Giralt D, Rost NS, Furie K, et al. B-type natriuretic peptides help in cardioembolic stroke diagnosis: pooled data meta-analysis. *Stroke*. 2015; 46: 1187-1195

Lou M, Safdar A, Mehdiratta M, Kumar S, Schlaug G, Caplan L, et al. The HAT score: a simple grading scale for predicting hemorrhage after thrombolysis. *Neurology*. 2008; 71: 1417-1423

## **M**

Martí-Fàbregas J, Borrell M, Cocho D, Belvís R, Castellanos M, Montaner J, et al. Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA. *Neurology*. 2005; 65: 366-370

Martínez-Morillo E, García-Hernández P, Begcevic I, Kosanam H, Prieto-García B, Alvarez-Menéndez FV, et al. Identification of novel biomarkers of brain damage in patients with hemorrhagic stroke by integrating bioinformatics and mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res* 2014; 13: 969-981

Mazya M, Egido JA, Ford GA, Lees KR, Mikulik R, Toni D, et al; SITS Investigators. Predicting the risk of symptomatic intracerebral hemorrhage in ischemic stroke treated with intravenous alteplase: safe Implementation of Treatments in Stroke (SITS) symptomatic intracerebral hemorrhage risk score. *Stroke*. 2012; 43: 1524-1531

McCabe DJ, Murphy SJ, Starke R, Harrison P, Brown MM, Sidhu PS, Mackie IJ, Scully M, Machin SJ. Relationship between ADAMTS13 activity, von Willebrand factor antigen levels and platelet function in the early and late phases after TIA or ischaemic stroke. *J Neurol Sci*. 2015; 348: 35-40

McKechnie F, Lewis S, Mead G. A pilot observational study of the association between fatigue after stroke and C-reactive protein. *J R Coll Physicians Edinb*. 2010; 40: 9-12

Medrano MJ, Boix R, Cerrato E, Ramírez M. Incidencia y prevalencia de cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular en España: revisión sistemática de la literatura. *Rev Esp Salud Pública*. 2006; 80: 5-15

Meisel C, Prass K, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, et al. Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke*. 2004; 35: 2-6

Mellick GD, Silburn PA, Sutherland GT, Siebert GA. Exploiting the potential of molecular profiling in Parkinson's disease: current practice and future probabilities. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10: 1035-1050

Menon BK, Saver JL, Prabhakaran S, Reeves M, Liang L, Olson DWM, et al. Risk score for intracranial hemorrhage in patients with acute ischemic stroke treated with intravenous tissue-type plasminogen activator. *Stroke*. 2012; 43: 2293-2299

Merino-Zamorano C, Hernández-Guillamon M, Jullienne A, Béhot AL, Bardou I, Parés M, et al. NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic Stroke. *Stroke*. 2015; 46: 477-484

Millán M, Sobrino T, Castellanos M, Nombela F, Arenillas JF, Riva E, et al. Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. *Stroke*. 2007; 38: 90-95

Mishra NK, Ahmed N, Andersen G, Egido JA, Lindsberg PJ, Ringleb PA, et al; VISTA collaborators; SITS collaborators. Thrombolysis in very elderly people: controlled comparison of SITS International Stroke Thrombolysis Registry and Virtual International Stroke Trials Archive. *BMJ*. 2010; 341: c6046

Moldes O, Sobrino T, Millán M, Castellanos M, de la Ossa N P, Leira R, et al. High serum levels of endothelin-1 predict severe cerebral edema in patients with acute ischemic stroke treated with t-PA. *Stroke*. 2008; 39: 2006-2010

Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas JF, et al. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001; 32: 1079-1084

Molina CA, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Abilleira S, Arenillas JF, Coscojuela P, et al. Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: a marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2002; 33: 1551-1556

Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003; 107: 598-603

Montaner J, Álvarez-Sabín J. La escala de Ictus del National Institute of Health (NIHSS) y su adaptación al español. *Neurología*, 2006; 21: 192-202

Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Ribó M, Huertas R, Rosell A, et al. Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke*. 2006; 37: 1205-1210 (2)

Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A, et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke*. 2008; 39: 2280-2287

Montaner J, Mendioroz M, Ribó M, Delgado P, Quintana M, Penalba A, et al. A panel of biomarkers including caspase-3 and D-dimer may differentiate acute stroke from stroke-mimicking conditions in the emergency department. *J Intern Med*. 2011; 270: 166-174

Montaner J, García-Berrocoso T, Mendioroz M, Palacios M, Perea-Gainza M, Delgado P, et al. Brain natriuretic peptide is associated with worsening and mortality in acute stroke patients but adds no prognostic value to clinical predictors of outcome. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 34: 240-245

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 133: e38-e360

Murray JL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2197-2223

## N

Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network; Brussels: European Society of Cardiology; Sophia Antipolis: 2012

Ning MM, Lopez M, Cao J, Buonanno FS, Lo EH. Application of proteomics to cerebrovascular disease. *Electrophoresis*. 2012; 33: 3582-3597



Nogueira RG, Gupta R, Jovin TG, Levy EI, Liebeskind DS, Zaidat OO, et al. Predictors and clinical relevance of hemorrhagic transformation after endovascular therapy for anterior circulation large vessel occlusion strokes: a multicenter retrospective analysis of 1122 patients. *J Neurointerv Surg.* 2015; 7: 16.21

Ntaios G, Faouzi M, Ferrari J, Lang W, Vemmos K, Michel P. An integer-based score to predict functional outcome in acute ischemic stroke: the ASTRAL score. *Neurology.* 2012; 78: 1916-1922

## O

O'Donnell MJ, Fang J, D'Uva C, Saposnik G, Gould L, McGrath E, et al; investigators of the registry of the Canadian Stroke Network. The PLAN score. A bedside prediction rule for death and severe disability following acute ischemic stroke. *Arch Intern Med.* 2012; 172: 1548-1556

Oldenbeuving AW, de Kort PL, Jansen BP, Roks G, Kappelle LJ. Delirium in acute stroke: a review. *Int J Stroke.* 2007; 2: 270-275

Oppenheim C, Samson Y, Manai R, Lalam T, Vandamme X, Crozier S, et al. Prediction of malignant middle cerebral artery infarction by diffusion-weighted imaging. *Stroke.* 2000; 31: 2175-2181

## P

Pascoe MC, Crewther SG, Carey LM, Noonan K, Crewther DP, Linden T. Homocysteine as a potential biochemical marker for depression in elderly stroke survivors. *Food Nutr Res.* 2012: 56

Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med.* 2008; 27: 157-172

Perry L, Love CP. Screening for dysphagia and aspiration in acute stroke: a systematic review. *Dysphagia.* 2001; 16: 7-18

Prosser J, MacGregor L, Lees KR, Diener HC, Hacke W, Davis S, et al. Predictors of early cardiac morbidity and mortality after ischemic stroke. *Stroke.* 2007; 38: 2295-2302

## Q

Qian L, Ding L, Cheng L, Zhu X, Zhao H, Jin J, et al. Early biomarkers for post-stroke cognitive impairment. *J Neurol* 2012; 259: 2111-2118

Qu L, Jiang M, Qiu W, Lu S, Zhao Y, Xia L, Ruan C, Zhao Y. Assessment of the Diagnostic Value of Plasma Levels, Activities, and Their Ratios of von Willebrand Factor and ADAMTS13 in Patients with Cerebral Infarction. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2016; 22: 252-259

## R

Reding M, Orto L, Willensky P, Fortuna I, Day N, Steiner SF, et al. The dexamethasone suppression test. An indicator of depression in stroke but not a predictor of rehabilitation outcome. *Arch Neurol.* 1985; 42: 209-212

Rem JA, Hachinski VC, Boughner DR. Value of cardiac monitoring and echocardiography after TIA and stroke patients. *Stroke.* 1985; 16: 950-956

Ribó M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Alvarez-Sabín J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 1146-1151

Rodríguez JA, Sobrino T, Orbe J, Purroy A, Martínez-Vila E, Castillo J, et al. ProMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 1464-1473

Rothenburg LS, Herrmann N, Swardfager W, Black SE, Tennen G, Kiss A, et al. The relationship between inflammatory markers and post stroke cognitive impairment. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010; 23: 199-205

Rubiera M, Alvarez-Sabín J, Ribo M, Montaner J, Santamarina E, Arenillas JF, et al. Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36: 1452-1456

## S

Salat D, Penalba A, Garcia-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: 220-227

Sanders B, Alonso A, Artemis D, Schäfer A, Ebert A, Kablau M, Fluechter S, Findeisen P, Hennerici MG, Fatar M. What Does Elevated High-Sensitive Troponin I in Stroke Patients Mean: Concomitant Acute Myocardial Infarction or a Marker for High-Risk Patients? *Cerebrovasc Dis.* 2013; 36: 211-217

Saposnik G, Raptis S, Kapral MK, Liu Y, Tu JV, Mamdani M, et al; investigators of the registry of the Canadian Stroke Network and the Stroke Outcomes Research Canada Working Group. The iScore predicts poor functional outcomes early after hospitalization for an acute ischemic stroke. *Stroke.* 2011; 42: 3421-3428

Saposnik G, Guzik AK, Reeves M, Ovbiagele B, Johnston SC. Stroke Prognostication using Age and NIH Stroke Scale: SPAN-100. *Neurology.* 2013; 80: 21-28

Saqqu M, Uchino K, Demchuk AM, Molina CA, Garami Z, Calleja S, et al, Investigators CLOTBUST. Site of arterial occlusion identified by transcranial Doppler (TCD) predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke. *Stroke* 2007; 38: 948-954

Saver JL. Optimal end points for acute stroke therapy trials: best ways to measure treatment effects of drugs and devices. *Stroke* 2011; 42: 2356-2362

Scherbakov N, von Haehling S, Anker SD, Dirnagl U, Doehner W. Stroke induced sarcopenia: muscle wasting and disability after stroke. *Int J Cardiol.* 2013; 170: 89-94

Schwarz S, Al-Shajlawi F, Sick C, Meairs S, Hennerici MG. Effects of prophylactic antibiotic therapy with mezlocillin plus sulbactam on the incidence and height of fever after severe acute ischemic stroke: The Mannheim Infection in Stroke Study (MISS). *Stroke.* 2008; 39: 1220-1227

Sellers C, Bowie L, Bagg J, Sweeney MP, Miller H, Tilston J. Risk factors for chest infection in acute stroke: a prospective cohort study. *Stroke.* 2007; 38: 2284-2291

Seners P, Turc G, Oppenheim C, Baron JC. Incidence, causes and predictors of neurological deterioration occurring within 24 h following acute ischaemic stroke: a systematic review with pathophysiological implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015; 86: 87-94

Serena J, Blanco M, Castellanos M, Silva Y, Vivancos J, Moro MA, et al. The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers. *Stroke.* 2005; 36: 1921-1926

Shi Q, Presutti R, Selchen D, Saposnik G. Delirium in acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2012; 43: 645-649

Siegler JE, Martin-Schild S. Early neurological deterioration (END) after stroke: the END depends on the definition. *Int J Stroke*. 2011; 6: 211-212

Smith CJ, Emsley H, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*. 2004; 4: 2

Smith CJ, Bray BD, Hoffman A, Meisel A, Heuschmann PU, Wolfe CD, et al. Can a Novel Clinical Risk Score Improve Pneumonia Prediction in Acute Stroke Care? A UK Multicenter Cohort Study. *J Am Heart Assoc*. 2015; 4: e001307

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: 2335-2340 (2)

Stewart GB, Altman DG, Askie LM, Duley L, Simmonds MC, Stewart LA. Statistical Analysis of Individual Participant Data Meta-Analyses: A Comparison of Methods and Recommendations for Practice. *PLoS ONE*. 2012; 7: e46042

Strbian D, Engelter S, Michel P, Meretoja A, Sekoranja L, Ahlhelm FJ, et al. Symptomatic intracranial hemorrhage after stroke thrombolysis: the SEDAN score. *Ann Neurol*. 2012; 71: 634-641

Strbian D, Meretoja A, Ahlhelm FJ, Pitkaniemi J, Lyrer P, Kaste M, et al. Predicting outcome of IV thrombolysis-treated ischemic stroke patients. The DRAGON score. *Stroke*. 2013; 44: 2718-2721

Strbian D, Michel P, Seiffge DJ, Saver JL, Numminen H, Meretoja A, et al. Symptomatic intracranial hemorrhage after stroke thrombolysis: comparison of prediction scores. *Stroke*. 2014; 45: 752-758

## T

Thanvi B, Treadwell S, Robinson T. Early neurological deterioration in acute ischaemic stroke: predictors, mechanism and management. *Postgrad Med J*. 2008; 84: 412-417

Teale EA, Forster A, Munyombwe T, Young JB. A systematic review of case-mix adjustment models for stroke. *Clin Rehabil*. 2012; 26: 771-786

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581-1587

Thomalla G, Hartmann F, Juettler E, Singer OC, Lehnhardt FG, Köhrmann M, et al. Prediction of malignant middle cerebral artery infarction by magnetic resonance imaging within 6 h of symptom onset: a prospective multicenter observational study. *Ann Neurol*. 2010; 68: 435-445

Touze E, Varenne O, Chatellier G, Peyrard S, Rothwell PM, Mas JL. Risk of myocardial infarction and vascular death after transient ischemic attack and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2005; 36: 2748-2755

Touze E, Coste J, Voicu M, Kansao J, Masmoudi R, Dooumenc B, et al. Importance of in-hospital initiation of therapies and therapeutic inertia in secondary stroke prevention: IMplementation of prevention after a cerebrovascular event (IMPACT) study. *Stroke*. 2008; 39: 1834-1843

Treadwell SD, Thanvi B: Malignant middle cerebral artery (MCA) infarction: pathophysiology, diagnosis and management. *Postgrad Med J*. 2010; 86: 235-242

Tzoulaki I, Siontis KC, Evangelou E, Ioannidis JP. Bias in associations of emerging biomarkers with cardiovascular disease. *JAMA Intern Med*. 2013; 173: 664-671

## U

Ulm L, Ohlraun S, Harms H, Hoffmann S, Klehmet J, Ebmeyer S, et al. STROKE Adverse outcome is associated With NoSocomial Infections (STRAWINSKI): procalcitonin ultrasensitive-guided antibacterial therapy in severe ischemic stroke patients - rationale and protocol for a randomized controlled trial. *Int J Stroke*. 2013; 8: 598-603

Urra X, Abilleira S, Dorado L, Ribó M, Cardona P, Millán M, et al; Catalan Stroke Code and Reperfusion Consortium. Mechanical Thrombectomy in and Outside the REVASCAT Trial Insights From a Concurrent Population-Based Stroke Registry. *Stroke*. 2015; 46: 3437-3442

## V

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: 604-607.

Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A, et al. DECIMAL, DESTINY, and HAMLET investigators. Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol*. 2007; 6: 215-222

Vargas M, Horcajada JP, Obach V, Revilla M, Cervera A, Torres F, et al. Clinical consequences of infection in patients with acute stroke: is it prime time for further antibiotic trials? *Stroke*. 2006; 37: 461-465

## W

Wang CX, Shuaib A: Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol*. 2007; 83: 140-148

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: 830614

Wartenberg KE. Malignant middle cerebral artery infarction. *Curr Opin Crit Care*. 2012; 18: 152-163

Weimar C, König IR, Kraywinkel K, Ziegler A, Diener HC. Age and National Institutes of Health Stroke Scale score within 6 hours after onset are accurate predictors of outcome after cerebral ischemia: development and external validation of prognostic models. *Stroke*. 2004; 35: 158-162

Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Vermeij JD, Dijkgraaf MG, van de Beek D. Poststroke infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*. 2011; 11: 110

Westendorp WF, Vermeij JD, Vermeij F, Den Hertog HM, Dippel DW, van de Beek D, et al. Antibiotic therapy for preventing infections in patients with acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 18 [CD008530]

Westendorp WF, Vermeij JD, Zock E, Hooijenga IJ, Kruijff ND, Bosboom HJ, et al; for the PASS investigators. The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): a pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial. *Lancet*. 2015; 385: 1519-1526

Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009; 40: e380-e389

Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, Lowe G, Rumley A, Sattar N, et al. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke*. 2012; 43: 86-91

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham study. *Stroke*. 1991; 22: 983-988

## **Y**

Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Zhang X, Li L. The serum interleukin-18 is a potential marker for development of post-stroke depression. *Neurol Res.* 2010; 32: 340-346

Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Yuan Y, Zhang X, et al. Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2011; 26: 495-502

Yusuf S. Two decades of progress in preventing vascular disease. *Lancet* 2002; 360: 2-3

## **Z**

Zhang X, Wang F, Zhang Y, Ge Z. Risk factors for developing pneumonia in patients with diabetes mellitus following acute ischaemic stroke. *J Int Med Res.* 2012; 40: 1860-1865

Zhan Y, Yang YT, You HM, Cao D, Liu CY, Zhou CJ, et al. Plasma-based proteomics reveals lipid metabolic and immunoregulatory dysregulation in post-stroke depression. *Eur Psychiatry* 2014; 29: 307-315

**CONDICIONANTES PRONÓSTICOS DEL ICTUS ISQUÉMICO: UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN SU PREDICCIÓN**

## **7. ABREVIACIONES**

## ABREVIACIONES

- NIHSS: escala de ictus del National Institutes of Health (*National Institutes of Health Stroke Scale*)
- mRS: escala de Rankin modificada (*modified Rankin scale*)
- rt-PA: activador tisular del plasminógeno recombinante (*recombinant tissue-type plasminogen activator*)
- DTC: doppler transcraneal
- TC: tomografía cerebral
- HTIC: hipertensión intracraneal
- ACM: arteria cerebral media
- DWI: imagen potenciada en difusión (*diffusion weighted image*)
- OR: odds ratio
- Curva ROC: curva característica operativa del receptor (*receiver operating characteristic curve*)
- IDI index: índice de mejoría de la discriminación integrada (*integrated discrimination improvement index*)
- IL: interleucina
- BNP: péptido natriurético tipo B (*B-type natriuretic peptide*)
- MMP: metaloproteasa de matriz (*matrix metalloproteinase*)
- CRP: proteína C-reactiva (*C-reactive protein*)
- FSAP: proteasa activadora del factor VII (*factor seven activating protease*)
- ADAMTS13: proteasa de clivaje del factor de Von Willebrand (*A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13*)
- CART: árbol de clasificación y regresión (*classification and regression tree*)
- Tn: troponina
- hs: ultrasensible (*high-sensitive*)