DESCUBRIMIENTO Y UTILIDAD CLÍNICA DE LOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN LA NEUMONÍA ASOCIADA A ICTUS

Dra. Olga Maisterra Santos
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron - VHIR
Dr. Francisco Moniche Álvarez
Hospitales Universitarios Virgen del Rocío - Sevilla

1. Resumen

La neumonía asociada al ictus (SAP, del inglés *stroke-associated pneumonia*) representa una de las complicaciones postictus más frecuentes y graves, lo que conlleva altas tasas de mortalidad y discapacidad, así como elevados costes y estancias hospitalarias para los pacientes que la desarrollan.

Hoy en día, no se ha demostrado que las terapias preventivas reduzcan el riesgo de SAP en pacientes con ictus. Además, el diagnóstico de SAP no es fácil para los médicos. Incluso en el terreno de la investigación, los criterios diagnósticos de SAP no son uniformes entre estudios. Nuestra hipótesis era que una mejor selección de los pacientes con mayor riesgo de esta complicación identificaría a una población que podría beneficiarse en el futuro de medidas terapéuticas específicas. Con estos antecedentes, el objetivo principal del proyecto era identificar, mediante diferentes enfoques, biomarcadores sanguíneos capaces de predecir el desarrollo de esta complicación. Además, el objetivo secundario era mejorar el diagnóstico de SAP mediante la validación de los criterios diagnósticos CDC modificados, propuestos por un grupo de expertos en 2015, así como evaluar el papel de la TC de alta resolución del tórax para la confirmación diagnóstica de la SAP.

Para cumplir con estos objetivos, llevamos a cabo un estudio prospectivo multicéntrico en 8 unidades de ictus de España que incluyó un total de 340 pacientes con ictus en las primeras 24 horas tras el inicio de los síntomas. Recolectamos dos muestras de sangre en esos pacientes; la primera, dentro de las primeras 24 horas, y una segunda muestra, 24 horas después. De estas muestras de sangre obtuvimos suero, plasma y RNA para el estudio de biomarcadores sanguíneos. Además, en un subgrupo de 120 pacientes, aislamos tres subpoblaciones leucocitarias (CD3+, CD14+, CD16+), de las que obtuvimos RNA y proteína para estudios de descubrimiento. A todos los pacientes se les realizó un seguimiento clínico diario durante los siete días posteriores al ingreso para determinar la aparición de neumonía. Posteriormente, tres meses después del infarto, también se evaluó su estado funcional. Además, en un subgrupo de pacientes con ictus grave se realizó una TC de alta resolución del tórax entre el 5.º y el 7.º día tras el ictus. El reclutamiento del estudio se vio afectado por el impacto de la pandemia de la COVID-19, que provocó la interrupción del reclutamiento durante tres meses y, posteriormente, una tasa de inclusión menor de lo previsto.

En cuanto a los biomarcadores, su determinación se realizó desde diferentes puntos de vista. En primer lugar, en una cohorte de 28 pacientes, de los cuales 14 desarrollaron SAP, se evaluaron biomarcadores conocidos, previamente descritos por el grupo, así como otros descritos en la literatura. Posteriormente se midieron los mejores biomarcadores discriminatorios en los 340 pacientes incluidos en toda la cohorte. Además, se realizaron experimentos de proteómica y transcriptómica en las tres subpoblaciones aisladas en un subgrupo de 12 pacientes (6 con SAP, 6 sin SAP), de los cuales se seleccionaron los mejores candidatos para evaluarlos en una cohorte más grande de 22 pacientes, mediante PCR en tiempo real (RT-PCR, para RNA) y transferencia Western (WB, para proteínas), en las mismas subpoblaciones. Los mejores candidatos de estos experimentos se validaron en cuanto a proteína en muestras de sangre periférica en una cohorte de 28 pacientes (en los dos tiempos) mediante ELISA.

2. Resultados

Los cuatro objetivos incluidos en el proyecto inicial se resumen aquí en dos.

OBJETIVO 1. Descubrimiento y validación de biomarcadores

Mediante técnicas de proteómica y transcriptómica en las diferentes subpoblaciones leucocitarias, linfocitos (CD3+), monocitos (CD14+) y neutrófilos (CD16+), identificamos que los neutrófilos eran la subpoblación que más cambios expresaba entre los pacientes que desarrollaban SAP o no. Además, el análisis bioinformático de estos resultados mostró que los procesos biológicos más afectados relacionados con la aparición de SAP fueron la desgranulación de neutrófilos y la activación de granulocitos. De este experimento se seleccionaron un total de tres proteínas candidatas del experimento de proteómica y 12 genes candidatos del experimento de transcriptómica, para su posterior validación en nuevas muestras de subpoblaciones leucocitarias, mediante RT-PCR y WB. Desafortunadamente, no pudimos identificar los tres candidatos provenientes del experimento de transcriptómica de neutrófilos por RT-PCR. Del resto de candidatos, YKL-40 y PGPRS (proteómica de neutrófilos), S100A8 y S100A12 (transcriptómica de linfocitos), adrenomedulina (transcriptómica de monocitos) y GADD45A (transcriptómica de sangre total) mostraron resultados en la misma línea que en el experimento de descubrimiento. En la validación final, por

ELISA, en muestras de sangre periférica, YKL-40 y S100A12 mostraron diferencias significativas entre pacientes con y sin SAP.

Con respecto a los biomarcadores candidatos, se exploró un panel de 9 biomarcadores, provenientes de la literatura y de resultados previos del grupo, en 38 pacientes en los dos tiempos. A partir de este experimento, se seleccionaron y evaluaron tres candidatos (CRP, MR-proADM y SAA) en toda la cohorte de pacientes (n = 340). Los tres biomarcadores mostraron niveles mayores en pacientes con SAP en ambos tiempos. El panel de tres biomarcadores mostró un buen valor predictivo para la SAP, especialmente en el segundo tiempo. De hecho, el panel mostró una sensibilidad del 83% y una especificidad del 60% en las primeras 24 horas (tiempo 1), y una sensibilidad del 91% y una especificidad del 76% a las 24-48 horas (tiempo 2), respectivamente. La inclusión de este panel en los modelos de regresión logística, junto con las variables clínicas, derivó en una mayor capacidad predictiva, de modo que aumentaban las áreas bajo las curvas ROC de 0,77 a 0,86 (tiempo 1) y de 0,86 a 0,92 (tiempo 2), respectivamente.

OBJETIVO 2. Mejora del diagnóstico clínico de SAP

En este objetivo evaluamos la utilidad de los criterios CDC modificados para el diagnóstico de la SAP, así como la observancia de estos criterios en la práctica clínica actual, en términos de diagnóstico de SAP e inicio de tratamiento. De los 340 pacientes incluidos, 72 (21,8%) desarrollaron alguna infección, de las cuales 38 (11,5%) fueron diagnosticadas como neumonía por los médicos. De estos casos, 24 (7,3%) cumplieron los criterios CDC modificados para la SAP. Se usaron antibióticos en el 92% de los pacientes que cumplieron los criterios CDC modificados y en el 50% de los que no. El principal predictor del uso de antibióticos fue la presencia de fiebre, y fue más determinante la presencia de síntomas aislados de infección en el momento de iniciar el tratamiento antibiótico que la combinación de varios síntomas cumpliendo criterios CDC modificados. Además, solo la SAP diagnosticada según los criterios CDC modificados, y no la neumonía diagnosticada a criterio clínico, demostró ser un predictor independiente de mala evolución funcional a los tres meses del ictus (OR = 4,84 [1,00-23,42]). Paralelamente, se obtuvieron imágenes de TC de alta resolución del tórax para confirmar el diagnóstico de SAP en 100 pacientes con ictus grave. Actualmente, estas imágenes se encuentran en proceso de lectura y próximamente se evaluará su utilidad para el manejo de la SAP.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Los resultados finales del presente proyecto podrían traducirse en el futuro en diferentes indicaciones clínicas, al menos en tres aspectos diferentes:

En primer lugar, desde el punto de vista clínico, hemos identificado una baja observancia en la práctica clínica actual de los criterios CDC modificados para el diagnóstico de la SAP, tanto respecto al diagnóstico como a la indicación de tratamiento, entendida como inicio de la administración de antibióticos. También hemos demostrado que la neumonía diagnosticada según los criterios CDC modificados representa un predictor independiente de mala evolución funcional tras un ictus, mientras que la neumonía diagnosticada según criterio clínico, sin cumplir criterios CDC modificados, no empeora la evolución clínica. A partir de estos datos podemos sugerir un uso sistemático de estos criterios en la práctica clínica, tanto para el diagnóstico de la SAP como para el inicio de la administración de antibióticos, lo que podría derivar en una reducción del uso de antibióticos y, por lo tanto, en la reducción de las resistencias bacterianas sin comprometer el pronóstico clínico.

En segundo lugar, hemos identificado un panel de biomarcadores sanguíneos, que incluye CRP, SAA y MR-proADM, capaces de predecir la SAP, con altos niveles de sensibilidad, especificidad y precisión. Además, estos biomarcadores pueden medirse de forma rutinaria en laboratorios clínicos y, por lo tanto, el uso de este panel en la práctica clínica podría ser inmediato una vez que la indicación clínica esté claramente definida. En un primer escenario, determinado por la alta sensibilidad del panel, estos biomarcadores podrían medirse en pacientes con algunos síntomas de neumonía (como la fiebre, que se definió como la covariable de mayor importancia para iniciar la administración de antibióticos). Un resultado negativo permitiría ahorrarse el uso de antibióticos. En un segundo escenario plausible, determinado por la alta especificidad del panel, podríamos identificar un subgrupo de pacientes con un riesgo muy alto de neumonía, que sería el mejor grupo candidato para probar futuros fármacos inmunomoduladores.

Finalmente, aunque todavía lejos de una aplicación clínica inmediata, los nuevos biomarcadores identificados en este proyecto, como YKL-40 y S100A12, abren nuevas líneas de investigación, no solo como nuevos biomarcadores para enriquecer el panel

anterior, sino también como nuevas dianas terapéuticas contra el desarrollo de la SAP, con el objetivo de modular la inmunosupresión inducida por ictus. En futuros proyectos de investigación profundizaremos en los datos ómicos obtenidos en este proyecto, con el objetivo de identificar nuevas terapias inmunomoduladoras mediante la biología de sistemas que puedan constituir una alternativa al uso de antibióticos para la prevención de esta dramática complicación.

Como línea de investigación futura, podemos visualizar un ensayo clínico basado en los resultados de los biomarcadores. El panel de biomarcadores se evaluaría en pacientes con sospecha de infección (definida por la presencia de algún ítem de los criterios del CDC, pero no cumpliéndolos todos), iniciando la administración de antibióticos o no dependiendo de los resultados del panel. Como continuación de este proyecto, hemos obtenido financiación adicional para llevar a cabo un nuevo proyecto, "Evaluating Lung Injury as a TargEt against Stroke-Associated Pneumonia (ELITE-SAP)", del Instituto de Salud Carlos III. Con esta iniciativa daremos continuidad a los estudios clínicos y preclínicos en SAP durante los próximos años.

4. Bibliografía científica generada

El presente proyecto ha generado hasta el momento un total de nueve presentaciones en congresos nacionales e internacionales, tres publicaciones en revistas internacionales, dos más en revisión y dos tesis doctorales.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Faura J, *et al.* "Análisis transcriptómico de subpoblaciones leucocitarias en pacientes con neumonía asociada al ictus". LXX Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología.

Bustamante A, *et al.* "Diagnóstico precoz de neumonía asociada al ictus mediante biomarcadores plasmáticos y correlación con tomografía computarizada de tórax de alta resolución". LXX Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología.

Bustamante A, *et al.* "Early diagnosis of stroke-associated pneumonia by blood biomarkers. Correlation with high-resolution computer tomography". International Stroke Conference 2019.

Zapata-Arriaza E, *et al.* "Tomografía computerizada de alta resolución de tórax como "gold standard" para la neumonía asociada al ictus: hallazgos radiológicos y validación de criterios clínicos". LXX Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología.

Faura J, *et al.* "Uso de técnicas–ómicas para el estudio de subpoblaciones leucocitarias en pacientes con neumonía asociada al ictus". III Congreso Anual de la Red INVICTUS+ 2019.

Faura J, *et al.* "Evaluation and characterization of the bronchoalveolar lavage fluid following cerebral ischemia in mice". European Stroke Organisation Conference 2021.

Bustamante A, *et al.* "Evaluación prospectiva de los criterios CDC modificados para el diagnóstico y manejo de la neumonía asociada al ictus. Utilidad de un panel de biomarcadores para su predicción". Congreso Anual de la Red INVICTUS+ 2021.

Bustamante A, *et al.* "Prospective clinical evaluation of the modified CDC criteria for diagnosis and management of stroke associated pneumonia". International Stroke Conference 2022.

Faura J, *et al.* "A panel of blood biomarkers provides high sensitivity to rule out stroke-associated pneumonia". European Stroke Organisation Conference 2022.

PUBLICACIONES

Schweizer J, Bustamante A, *et al. Serum amyloid a – a novel predictor of stroke associated infections*. Stroke. 2020; 51: 3523-3530.

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

Faura J, Bustamante A, *et al. Blood biomarkers panels for the early prediction of stroke-associated complications*. JAHA 2021; 10: e018946.

Maisterra O, Ezcurra G, *et al. Factors determining antibiotic initiantion in acute stroke patients*. Stroke. (Manuscrito en revisión).

Faura J, Ramiro L, *et al. Evaluation and characterization of the bronchoalveolar lavage fluid following cerebral ischemia in two rodent stroke models*. Trans Stroke Res. (Manuscrito en revisión).
TESIS DOCTORALES

Júlia Faura Llorens. "Noves estratègies per a la predicció i prevenció de la pneumòmia associada a l'ictus". Universitat Autònoma de Barcelona (27 de septiembre de 2021). *Cum laude*.

Elena Zapata Arriaza. "SIPIA-CT: stroke induced 8neumònia in Andalucia: detection and validation of clinical-biological markers of stroke-associated pneumonia". Universidad de Sevilla (24 de junio de 2020). *Cum laude*.