



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

TESI DOCTORAL

Barcelona, 2022

# ELS BIOMARCADORS SANGUINIS COM A EINES PER A LA PREVENCIÓ DEL ICTUS ASSOCIAT A LA FIBRIL·LACIÓ AURICULAR

ELENA PALÀ VILA

---

**Doctorat en Neurociències**

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

**Laboratori d'Investigació Neurovascular**

Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR)

---

DIRECTORS:

Dr. Alejandro Bustamante Rangel

Dr Joan Montaner Villalonga

TUTOR:

Dr Joan Montaner Villalonga



Aquesta Tesi Doctoral s'ha dut a terme al Laboratori d'Investigació Neurovascular de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebrón amb el suport d'una beca predoctoral atorgada per l'Institut de Recerca del Vall d'Hebrón i finançada per la iniciativa de micromecenatge *Amics del VHIR*. També s'ha rebut suport del programa de la unió europea d'innovació i recerca Horizon 2020 (GA No 754517 i GA 847770).

El laboratori d'Investigació Neurovascular forma part de la xarxa d'Investigació RICORS-ICTUS (RD21/0006/0007) i està parcialment finançat pel fons d'investigacions Sanitàries de l'Institut de Salut Carlos III (PI15/00354 i PI18/00804) i co-finançat pel fons europeu del Desenvolupament Regional (FEDER).



RESUM.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURES.....	5
1.INTRODUCCIÓ.....	7
1.1. L'ictus.....	9
1.1.1. Epidemiologia i aspectes clínics .....	9
1.1.2. Etiologia del ictus isquèmic .....	10
1.1.2.1. Ictus cardioembòlic .....	11
1.1.2.2. Ictus aterotrombòtic .....	12
1.1.2.3. Ictus llacunar .....	12
1.1.2.4. Ictus per altres causes conegudes.....	12
1.1.2.5. Ictus d'etiologia indeterminada/ESUS.....	13
1.2. La fibril·lació auricular .....	14
1.2.1. Epidemiologia i aspectes clínics .....	14
1.2.2. Fisiopatologia de la FA.....	16
1.2.4. Infart cerebral silent i FA .....	19
1.2.5. Cribratge de fibril·lació auricular. Estratègies de prevenció primària.....	20
1.2.6. Cerca de fibril·lació auricular després d'un ictus. Estratègies de prevenció secundària .....	22
1.3. Biomarcadors sanguinis en l'ictus .....	23
1.3.1. Biomarcadors d'etiologia de l'ictus .....	24
1.3.1.1 L'exemple dels pèptids natriurètics .....	26
1.3.2. Procés de descobriment de nous biomarcadors .....	28
2.OBJECTIUS .....	31
3.MÈTODES.....	35
3.1. Estudi AFRICAT .....	37
3.2. Estudi CRYPTO-FA.....	37
3.3. Estudi PARIAS .....	38
3.4. Mesura de biomarcadors .....	39
3.4.1. La tècnica SOMAScan .....	39
3.5. Resum d'anàlisis estadístics .....	40

4.RESULTATS.....	43
4.1. N-Terminal Pro B-Type Natriuretic Peptide’s Usefulness for Paroxysmal Atrial Fibrillation Detection Among Populations Carrying Cardiovascular Risk Factors.....	45
4.2. Blood-biomarkers and devices for atrial fibrillation screening: lessons learned from the AFRICAT (Atrial Fibrillation Research In CATalonia) study.....	49
4.3. B-type natriuretic peptide over N-terminal pro-brain natriuretic peptide to predict incident atrial fibrillation after cryptogenic stroke.....	69
4.5. Proteins and pathways in atrial fibrillation and atrial cardiomyopathy underlying cryptogenic stroke.....	73
4.4. Blood-based biomarkers to search for atrial fibrillation in high-risk asymptomatic individuals and cryptogenic stroke patients.....	95
4.5. Association of blood-based biomarkers with silent brain infarcts in patients with atrial fibrillation.....	115
5.DISCUSSIÓ.....	125
4.1. Reptes en el cribatge de fibril·lació auricular. La incorporació dels biomarcadors.....	127
4.2. L’ús de biomarcadors per identificar FA després d’un ictus.....	130
4.3. Les dificultats en els estudis de descobriment de nous biomarcadors de FA. El paper de la cardiomiopatia atrial. ....	132
4.4. Comparació del potencial ús clínic de biomarcadors candidats en diferents etapes de la FA .....	135
4.5. Perspectives de futur .....	138
6.CONCLUSIONS .....	143
7.BIBLIOGRAFIA .....	147
8.ANNEX .....	161

## RESUM

L'ictus és una de les principals causes de mort i discapacitat a escala mundial. La fibril·lació auricular (FA) és una arrítmia cardíaca freqüent amb una prevalença de l'1-4% en la població general. Aquesta augmenta per 5 el risc a patir un ictus isquèmic i a més pot ser una de les causes subjacents rere un gran nombre d'ictus criptogènics/ESUS. En presència d'aquesta arrítmia la teràpia anticoagulant pot reduir el risc d'ictus. No obstant això, la FA sovint es presenta de forma asimptomàtica i paroxística, fet que en dificulta la seva detecció. A més, la FA també s'ha postulat com una causa d'infarts silencis (IS), fins i tot en casos de FA considerada de baix risc embolic segons les escales clíniques CHADS<sub>2</sub> i CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc. La detecció d'IS es podria considerar una manifestació inicial de la malaltia cerebrovascular que requereix la implementació d'estratègies de prevenció en aquests pacients.

Els biomarcadors sanguinis podrien ser eines útils en el diagnòstic i maneig de la FA gràcies a la "memòria biològica" que presenten. A més, els biomarcadors ens poden donar informació sobre la patofisiologia de la FA i la seva relació amb la patologia cerebrovascular. Malgrat que s'han proposat múltiples molècules candidates en aquest context, de moment cap d'aquestes s'utilitza en la pràctica clínica.

Aquesta tesi doctoral té l'objectiu d'identificar biomarcadors sanguinis de FA i descriure la seva aplicació en contextos de prevenció primària i secundària de l'ictus. Amb aquest objectiu s'han utilitzat mostres de sang de pacients inclosos en tres cohorts, les quals són representatives de diferents indicacions com és el diagnòstic de FA en poblacions asimptomàtiques i en ictus criptogènics, o la detecció d'IS en pacients amb FA. Els estudis que integren aquesta tesi han avaluat l'ús de biomarcadors ja descrits en la bibliografia en aquestes indicacions clíniques.

Com a resultat, hem evidenciat que per si sols els biomarcadors estudiats no són capaços de detectar casos de FA paroxística en pacients asimptomàtics, reduint-ne el potencial com a eines de cribratge poblacional. Tanmateix, la seva combinació amb dispositius de detecció ràpida com MyDiagnostick o WatchBP s'hauria d'explorar. En canvi, en prevenció secundària, tant BNP com NT-proBNP són predictors de FA detectada durant el primer mes després d'un ictus criptogènic, amb resultats lleugerament millors pel que fa a BNP. En ambdues situacions, pel que fa a la detecció de FA, els pèptids natriurètics són els candidats que han mostrat millors resultats. La seva combinació amb biomarcadors representatius d'altres vies com pot ser Ang-2, marcador de dany endotelial, podria augmentar-ne la capacitat diagnòstica. D'altra banda, Ang-



2, juntament amb BMP-10 i FGF-23 presenten nivells més elevats en pacients amb FA de baix risc embolic i IS respecte a pacients sense infarts.

Finalment, hem realitzat estudis de descobriment de nous biomarcadors que poguessin complementar els que ja estan descrits utilitzant una plataforma proteòmica basada en els aptàmers de DNA. Aquests estudis ens han permès identificar i explorar proteïnes i vies que podrien ser rellevants en la patofisiologia de la FA. D'aquests, cal destacar, DPP7 com a possible biomarcador d'etiologia de l'ictus. A més, hem proposat una nova aproximació per descobrir nous biomarcadors i vies en aquest context, tenint en compte el concepte de cardiomiopatia atrial i usant paràmetres ecocardiogràfics.

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi contribueixen en una visió aplicada de l'ús dels biomarcadors sanguinis en el maneig de la FA. En un futur, alguns d'aquests marcadors es podrien implementar en la pràctica clínica per tal de millorar les estratègies de prevenció de l'ictus.

## ABSTRACT

Stroke is one of the main causes of death and disability worldwide. Atrial fibrillation (AF) is a common cardiac arrhythmia with a prevalence of 1-4% in the general population. It increases the risk of ischemic stroke by 5 and may also be one of the underlying causes of many cryptogenic strokes/ESUS. In the presence of this arrhythmia, anticoagulant therapy may reduce the risk of stroke. However, AF is often asymptomatic and paroxysmal, difficulting its detection. In addition, AF has also been postulated as a cause of silent brain infarcts (SBI), even in AF considered of low embolic risk according to the CHADS<sub>2</sub> and CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc clinical scores. Detection of SBI could be considered an initial manifestation of cerebrovascular disease, requiring the implementation of prevention strategies in these patients.

Blood biomarkers could be useful tools in the diagnosis and management of AF thanks to their "biological memory". In addition, biomarkers can give us information about the pathophysiology of AF and its relationship to cerebrovascular pathology. Although multiple candidate molecules have been proposed in this context, none of them are currently used in clinical practice.

This Doctoral Thesis aims to identify blood biomarkers of AF and describe its application in contexts of primary and secondary stroke prevention. For this purpose, we used blood samples from patients included in three cohorts representing different clinical indications, such as the diagnosis of AF in asymptomatic populations and cryptogenic strokes, or the detection of SBI in patients with AF. Therefore, the studies of this thesis have evaluated the use of biomarkers already described in the literature in these clinical indications.

As a result, we have shown that the biomarkers studied were not able to detect cases of paroxysmal AF alone in asymptomatic patients, reducing their potential as population-based screening tools. However, its combination with rapid AF detection devices such as MyDiagnostick or WatchBP should be explored. In contrast, in secondary prevention, both BNP and NT-proBNP were predictors of AF detected during the first month after a cryptogenic stroke, with BNP showing slightly better results. In both cases, in terms of the detection of AF, natriuretic peptides were the candidates showing the best results. Its combination with biomarkers from other pathways such as Ang-2, marker of endothelial damage, could increase its diagnostic capacity. On the other hand, Ang-2 along with BMP-10 and FGF-23 showed higher levels in patients with low-risk AF and SBI in comparison to patients without SBI.

Finally, we conducted discovery biomarker studies using a proteomic platform based on the technology of DNA aptamers in order to identify new biomarkers that could complement those already described. These studies have allowed us to identify and explore proteins and pathways that could be relevant in the pathophysiology of AF. Of these, DPP7 should be further explored as a possible biomarker of stroke etiology. In addition, we have proposed a new approach to discover new biomarkers and pathways in this context, taking into account the concept of atrial cardiomyopathy and using echocardiographic parameters.

Overall, the results of this thesis contribute to an applied view of the use of blood biomarkers in the management of AF. In the future, some of these markers could be implemented in clinical practice in order to improve stroke prevention strategies.

## ABREVIATURES

ACOD	anticoagulants orals d'acció directa
AHRE	<i>atrial high-rate episodis</i>
AIT	accident isquèmic transitor
Ang-2	<i>Angiotensin-2</i>
ANP	pèptid natriurètic auricular o tipus A
AUC	<i>area under the curve</i>
BMP-10	<i>bone morphogenic protein 10</i>
BNP	pèptid natriurètic tipus B
CNP	pèptid natriurètic tipus C
DKK3	<i>Dickkopf related protein 3</i>
ECG	electrocardiograma
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ESC,	<i>European Society of Cardiology</i>
ESM-1	<i>Endothelial cell-specific molecule 1</i>
ESUS	<i>Embolic stroke of undetermined source</i>
FA	fibril·lació auricular
FC	<i>fold-change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FGF-23	<i>fibroblast growth factor 23</i>
GDF-15	<i>growth differentiation factor 15</i>
GWAS	<i>genome wide association studies</i>
IDI	<i>integrated discriminatory index</i>
IGFBP7	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 7</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IS	ictus silent
LAVI	<i>left atrial volume index</i>

Lp(a)	lipoproteïna a
Lp-PLA2	fosfolipasa A2 associada a la lipoproteïna
MR-proANP	<i>Midregional pro-atrial natriuretic peptide,</i>
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NT-proBNP	<i>N-terminal pro natriuretic peptide</i>
OMS	Organització mundial de la salut
OR	<i>odd ratio</i>
PALS	<i>peak atrial longitudinal strain</i>
PEA	<i>proximity extension assay</i>
POC	<i>Point of Care</i>
PPG	fotopletismografia
PTFV1	<i>P-wave terminal force in lead V1</i>
RM	ressonància magnètica
rt-PA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
SRA	<i>Stroke Risk Analysis</i>
TC	TAC craneal
TNK	tenecteplasa
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
USPSTF	<i>United States Preventive Services Task Force</i>



# 1. INTRODUCCIÓ



## 1.1. L'ictus

### 1.1.1. Epidemiologia i aspectes clínics

L'ictus o malaltia cerebrovascular es defineix com un dèficit neurològic degut a una lesió focal aguda del sistema nerviós central produïda per una causa vascular.<sup>1</sup>

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) calcula que 15 milions de persones pateixen un ictus anualment, de les quals 5 milions moren i 5 milions pateixen discapacitats permanents. De fet, segons estadístiques recents, l'ictus és la malaltia que causa més morts i discapacitats en població adulta a escala mundial, després de l'infart de miocardi.<sup>2</sup> A Espanya, l'ictus també és la segona causa de mort i la primera en dones, amb una incidència de 187 casos per cada 100.000 habitants, similar a la d'altres països europeus.<sup>3,4</sup> A més, el cost econòmic de la malaltia és molt elevat, causant uns costos directes de 20 bilions d'euros en la unió europea, mentre que s'estima que els costos indirectes s'elevan a 25 bilions més.<sup>4</sup>

Segons la naturalesa de l'alteració vascular causant, l'ictus es classifica en isquèmic o hemorràgic, amb una proporció aproximada del 80% i el 20%, respectivament. L'ictus isquèmic es caracteritza per la interrupció de la circulació sanguínia en una zona del cervell a causa de l'oclusió d'un vas; mentre que l'hemorràgic es produeix per l'extravasació de sang dins la cavitat cranial, secundària a la ruptura d'un vas sanguini.<sup>5</sup> La present tesi se centra en l'estudi de l'ictus isquèmic i per tant d'aquí en endavant s'utilitzaran els termes ictus i ictus isquèmic indistintament.

Les manifestacions clíniques de l'ictus variaran depenent del territori afectat, però entre les més freqüents trobem l'alteració del llenguatge (afàsia), la pèrdua de força i sensibilitat d'un costat del cos (hemiparèsia, hemihipoestesia), la pèrdua de visió (hemianòpsia) i el vertigen, entre d'altres. S'han descrit diverses escales prehospitalàries per identificar els pacients que pateixen un ictus considerant alguns dels símptomes anteriors, com la Cincinnati Pre-Hospital Stroke Scale (SPSS) o la Face Arm Speech Time (FAST).<sup>6</sup> A Catalunya, com adaptació de l'escala FAST, es va dissenyar l'eina RAPID (Riu, Aixeca els braços, Parla, Ictus, De pressa), que permet identificar quadres clínics sospitosos d'ictus a la vegada que sensibilitzar i conscienciar la població.<sup>7</sup>

Davant la sospita d'un ictus, el diagnòstic confirmatori es realitza principalment per proves de neuroimatge, com la tomografia computada o la ressonància magnètica cranial. Aquestes són de vital importància per excloure lesions d'origen no vascular amb simptomatologia similar (anomenades ictus/stroke-mimics), així com diferenciar els ictus isquèmics dels hemorràgics.<sup>5</sup> L'estat neurològic del pacient i la gravetat del dany cerebral s'avalua mitjançant escales com la



NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*) que amb 15 ítems atorga una puntuació entre 0 i 42 punts, sent més greus els ictus amb major puntuació.<sup>8</sup>

Actualment, un cop diagnosticat l'ictus isquèmic, l'únic tractament farmacològic aprovat en la fase aguda és el tractament trombolític mitjançant l'activador tissular del plasminogen recombinant (rt-PA), que es pot administrar intravenosament sempre que no s'hagin superat les 4,5 hores després de l'aparició dels primers símptomes.<sup>9</sup> Aquest fàrmac catalitza la conversió del plasminogen a plasmina, que a la vegada degrada la fibrina, component principal dels coàguls sanguinis. De tota manera, la reduïda finestra terapèutica, així com les nombroses contraindicacions d'aquest tractament, limita el nombre de pacients que se'n poden beneficiar. En els últims anys s'ha proposat la tenecteplasa (TNK) com a alternativa al rt-PA. De fet, en un meta-anàlisis recent es va observar que els pacients amb oclusions de gran vas tractats amb TNK obtenien millor pronòstic i tasses de recanalització que aquells tractats amb rt-PA.<sup>10</sup>

Per altra banda, l'ús de la trombectomia mecànica per extreure trombes de grans vasos, ha augmentat en els últims anys, des de la realització dels primers assaigs clínics que en van demostrar la seva eficàcia.<sup>11</sup> Aquestes intervencions permeten augmentar la finestra terapèutica fins a les 24 hores, però només es poden realitzar en centres especialitzats.<sup>12</sup>

Tot i les eines actuals, un 15% de pacients que pateixen un ictus moren durant l'estança hospitalària,<sup>13</sup> i dels supervivents, s'estima que després de 15 anys, un 63% viuen amb algun tipus de discapacitat.<sup>14</sup> Per aquest motiu, és de gran importància disminuir la incidència d'aquesta malaltia actuant sobre factors de risc modificables o potencialment modificables que s'ha calculat que són responsables del 90% del risc d'ictus.<sup>15</sup> Alguns dels factors de risc modificables més importants relacionats amb l'ictus són la hipertensió, la diabetis, l'obesitat i l'estil de vida (vida sedentària, dieta i consum d'alcohol i tabac); i també malalties cardíaques com la fibril·lació auricular (FA), de la qual en parlarem amb detall més endavant.<sup>15</sup> A més, cal destacar que entre un 25 i un 30% dels ictus es produeixen en pacients que ja n'han patit un. Per tant, l'estudi etiològic per establir la causa subjacent de l'ictus i l'adequada prevenció secundària són essencials per reduir-ne les recurrències.<sup>16</sup>

### 1.1.2. Etiologia del ictus isquèmic

Existeixen diversos sistemes de classificació que separen l'ictus isquèmic en diferents grups segons quina en sigui la causa de l'oclusió vascular.<sup>17</sup> El sistema TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*), descrit l'any 1993, és el sistema més utilitzat. Aquest es basa en les

característiques clíniques, així com els resultats de les proves de neuroimatge (TC o RM), i altres tests diagnòstics (electrocardiograma, ecocardiografia cardíaca, estudi d'ultrasò de les artèries extra-cranials i, angiografia, entre d'altres), per dividir els ictus isquèemics en els següents subtipus: ictus aterotrombòtic (23%), cardioembòlic (22%), lacunar (22%), altres causes conegudes (3%), i ictus d'etiologia indeterminada (26%).<sup>18</sup> Entre parèntesis es mostra el percentatge de pacients atribuïble a cada subtipus segons dades d'un meta-anàlisis recent, però, s'ha de tenir en compte que els percentatges varien molt depenent de la població estudiada. En població caucàsica l'ictus cardioembòlic és el més freqüent actualment (28%), degut sobretot a l'envelliment de la població, mentre que en població asiàtica hi ha un percentatge més alt d'ictus aterotrombòtics (33%).<sup>19</sup> Els sistemes SSS-TOAST (*Stop Stroke Study TOAST*)<sup>20</sup> i CSS (*Causative Classification System*)<sup>21</sup> són actualitzacions del TOAST original tenint en compte avanços clínics i en tècniques d'imatge. Els dos sistemes estan compostos per les mateixes cinc categories amb l'afegit que a cada categoria s'assignen tres possibles graus de causalitat: evident, probable o possible. Per altra banda, les classificacions ASCO (*Atherosclerosis, Small vessel disease, Cardiac pathology, and Other causes*)<sup>22</sup>, i ASCOD (*Atherosclerosis, Small vessel disease, Cardiac pathology, Other causes, and Dissection*)<sup>23</sup> són sistemes fenotípics, i, a diferència dels sistemes de classificació anteriors, que caracteritzen únicament la causa més probable de l'ictus, aquests descriuen totes les patologies que presenta el pacient que poden potencialment ocasionar un ictus. Tot i que aquestes últimes puntuacions són més precises, la simplicitat dels criteris TOAST fa que aquest continuï sent el sistema més popular i àmpliament usat.

### 1.1.2.1. Ictus cardioembòlic

L'ictus cardioembòlic es produeix per un coàgul sanguini originat al cor que viatja a través de la circulació arterial fins a causar una obstrucció en una artèria cerebral. Hi ha tres mecanismes principals pels quals es pot produir un embolisme del cor al cervell: estasi sanguínia i formació d'un coàgul en una de les cavitats esquerres del cor, despreniment de material d'una superfície valvular anormal, o l'alteració del pas de circulació venosa a la circulació arterial (embolisme paradoxal). En aquests mecanismes també influeixen factors protrombòtics i inflamatoris. Majoritàriament, els ictus cardioembòlics afecten el territori cortical. A més, són ictus més greus i invalidants en comparació a altres subtipus, ja que freqüentment afecten grans artèries deixant sense irrigació territoris més grans.<sup>24</sup> Un gran nombre d'afectacions cardíques presenten potencial embòlic. La FA és la causa més comuna d'ictus cardioembòlic i es tractarà en profunditat en els pròxims apartats. Altres fonts cardioembòliques importants són la insuficiència cardíaca congestiva amb fracció d'ejecció reduïda, l'infart de miocardi recent,

pròtesis valvulars mecàniques, i l'endocarditis, entre d'altres.<sup>25</sup> L'anticoagulació oral és la teràpia d'elecció per a la prevenció secundària de la majoria de causes d'ictus isquèmic cardioembòlic.<sup>7</sup>

### *1.1.2.2. Ictus aterotrombòtic*

L'ictus aterotrombòtic, també anomenat ictus per aterosclerosi de grans vasos, es pot produir per l'estenosi i/o oclusió de les artèries intra o extra cranials a causa de l'acumulació de placa d'ateroma. A part de l'oclusió in situ degut a la complicació trombòtica d'una placa d'ateroma, aquestes plaques es poden trencar, despendre's i produir un èmbol que obstrueixi una artèria distal. A més, en casos d'estenosis greus, es poden produir descensos importants de la pressió de perfusió cerebral desencadenant el que es coneix com a infarts hemodinàmics. Segons la classificació TOAST un ictus és aterotrombòtic quan una gran artèria mostra un percentatge d'estenosis superior al 50%, presumptament degut a l'aterosclerosi. Aquesta estenosi s'ha de poder demostrar amb proves diagnòstiques com l'ecografia-Doppler, l'angio-RM, o el angio-TAC, i s'han d'haver descartat les principals causes cardioembòliques.<sup>18</sup> El tractament dels factors de risc vascular, l'antiagregació i els tractaments revascularitzants com l'endoarteriectomia, o l'angioplàstia en alguns casos, són les opcions de prevenció secundària més freqüents en l'ictus aterotrombòtic.<sup>7</sup>

### *1.1.2.3. Ictus llacunar*

Com a ictus llacunar es classifiquen els infarts petits (menor de 1,5 cm de diàmetre) provocats per l'oclusió d'artèries perforants del cervell i les seves ramificacions. Els pacients normalment manifesten síndromes llacunars típics (hemiparèsia motora pura, síndrome sensitiva pura, síndrome sensitivomotora, hemiparèsia-atàxia i/o disàrtria mà feixuga). La microateromatosi i la lipohialinosis de les artèries perforants cerebrals, sovint conseqüència de l'exposició constant a la hipertensió arterial, constitueixen els substrats patològics més freqüents d'aquest tipus d'infarts.<sup>26</sup> Alguns d'aquests ictus poden haver passat desapercebuts degut a l'absència de símptomes i constitueixen el que es coneix com a ictus silencis (IS).

### *1.1.2.4. Ictus per altres causes conegudes*

En aquesta categoria s'inclouen pacients amb causes poc freqüents un cop s'han descartat les etiologies anteriors. En aquest grup s'inclouen arteriopaties diferents de l'arterioscleròtica (vasculitis, dissecció arterial, displàsia fibromuscular, aneurisma sacular, malformació arteriovenosa, trombosi venosa cerebral, malaltia de Moya-Moya, síndrome de Sneddon...), i alguns trastorns sistèmics com la migranya, connectivopaties, neoplàsies, processos infecciosos, o trastorns de la coagulació, entre d'altres. En aquest grup, el tractament de prevenció secundària dependrà de la causa específica.<sup>7</sup>

### 1.1.2.5. *Ictus d'etiologia indeterminada/ESUS*

Els ictus d'etiologia indeterminada o criptogènics comprenen un grup heterogeni de pacients en els quals la causa de l'íctus és desconeguda. En aquest grup, i segons la classificació TOAST, s'inclouen pacients en els quals no s'ha identificat cap causa tot i una extensiva avaluació clínica, els que l'avaluació clínica no ha estat completa, o aquells en què s'han identificat dues o més causes potencials.<sup>18</sup> Aquesta entitat diagnòstica té poca utilitat clínica ja que és un grup molt ampli i variable dependent dels circuits diagnòstics de cada hospital.

Sota la premissa que la majoria d'ictus criptogènics eren embòlics, el 2014 es va proposar el constructe d'íctus embòlic d'origen indeterminat (ESUS, de l'anglès *Embolic stroke of undetermined source*). Els ESUS són ictus no lacunars en els que després d'una avaluació diagnòstica suficient s'han descartat les principals causes cardioembòliques, la aterosclerosi extra o intra cranial, així com qualsevol altra causa específica d'íctus.<sup>27</sup> La freqüència reportada d'ESUS es troba al voltant del 17%, tot i que pot variar entre el 9 i el 25% dependent de l'estudi. Els pacients amb ESUS són més joves i tenen una prevalença més baixa de factors de risc cardiovascular en comparació a altres etiologies.<sup>28</sup>

La hipòtesi que la causa subjacent d'una gran part d'ESUS podria ser la FA oculta va ser la base per dissenyar assaigs clínics comparant l'anticoagulació oral directa amb l'antiagregació plaquetària en aquesta població.<sup>29,30</sup> L'estudi NAVIGATE ESUS, que comparava l'eficàcia i seguretat del fàrmac rivaroxaban versus l'aspirina, va ser aturat precoçment degut a un augment del risc de sagnat en el grup que prenia rivaroxaban. Posteriorment, en l'anàlisi d'eficàcia, es va demostrar que el tractament amb rivaroxaban no disminuïa les taxes de recurrència d'íctus.<sup>31</sup> Per altra banda, el RE-SPECT ESUS comparava l'ús de dabigatran versus aspirina. Tot i que aquest assaig va demostrar que el dabigatran no incrementava el risc d'hemorràgies importants en comparació amb l'aspirina en pacients amb ESUS, tampoc es van trobar diferències pel que fa a l'eficàcia entre els dos grups.<sup>32</sup>

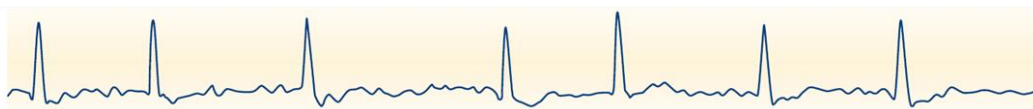
Els resultats negatius dels assaigs NAVIGATE i RE-ESPECT han fet que en els últims anys alguns autors hagin qüestionat la utilitat del constructe ESUS, i que remarquin la necessitat d'estudis diagnòstics més exhaustius en aquests pacients per determinar la causa definitiva de l'íctus.<sup>33,34</sup> A més, tot i que aquests assaigs no van permetre demostrar l'eficàcia dels anticoagulants orals en tots els pacients amb ESUS, subanàlisis posteriors indiquen que alguns subgrups (ex. pacients amb edat avançada o amb aurícula dilatada) es podrien beneficiar d'aquests tractaments.<sup>35,36</sup>

## 1.2. La fibril·lació auricular

### 1.2.1. Epidemiologia i aspectes clínics

La fibril·lació auricular (FA) és una taquiarrítmia supraventricular amb activació auricular descoordinada que com a conseqüència provoca una contracció auricular ineficaç. En un electrocardiograma (ECG) es caracteritza per intervals R-R irregulars amb absència de ones P i activacions auriculars irregulars (Figura 1). Segons les guies de la societat europea de cardiologia (ESC, de l'anglès *European Society of Cardiology*), per tal de diagnosticar una FA cal un traçat electrocardiogràfic valorable on s'aprecii un episodi de duració superior als 30 segons.<sup>37</sup>

#### Fibril·lació auricular



#### Ritme sinusal



**Figura 1:** ECG típic de fibril·lació auricular en comparació a un ECG en ritme sinusal (Adaptada de Lip et al, 2016).<sup>38</sup>

La FA és una de les arrítmies cardíques més freqüents, amb una prevalença de l'1-4% de la població general. Aquesta augmenta amb l'edat afectant fins al 10-20% de la població major de 80 anys.<sup>39,40</sup> A més, a conseqüència de l'augment de l'esperança de vida s'espera que el nombre d'individus afectats per FA augmenti de forma exponencial durant els pròxims anys, constituint un important problema de salut públic.<sup>41</sup> A part de l'edat, el sexe masculí, el consum d'alcohol i tabac, i algunes comorbiditats com la hipertensió, la diabetis, l'obesitat, la insuficiència cardíaca i la insuficiència renal, entre d'altres, són considerats factors de risc de FA.<sup>38</sup>

La FA augmenta per 5 el risc de patir un ictus isquèmic i també s'associa a un risc augmentat de patir insuficiència cardíaca, demència o mort.<sup>42</sup> Fatiga, palpitations i/o dispnea són alguns dels símptomes que poden presentar els pacients amb FA, però moltes vegades els símptomes són inexistents i la FA és diagnosticada de forma casual quan es realitza un ECG de rutina, o després que hagi aparegut alguna de les seves complicacions, com pot ser un ictus. Un cop detectada, la FA es classifica depenent de la duració dels episodis en els següents grups:<sup>37</sup>

- Paroxística: FA que desapareix espontàniament o gràcies a una intervenció en menys de 7 dies.
- Persistent: FA que es presenta de forma continuada durant més de 7 dies.
- Persistent de llarga duració: FA que es presenta de forma continuada durant més d'un any.
- Permanent: FA com a ritme establert després de desestimar els tractaments per controlar el ritme cardíac.

Les categories anteriors corresponen al que s'anomena FA clínica. Per altra banda, existeixen els episodis auriculars d'alta freqüència (AHRE, de l'anglès *high-rate episodis*), que són episodis curts i asimptomàtics detectats arran del monitoratge cardíac prolongat amb marcapassos o dispositius implantables, i que constitueixen el que anomenem FA subclínica en cas de ser confirmats. Tot i que aquest tipus de FA és molt comú no està clar la seva significança clínica ni existeix evidència de quina és la millor estratègia de maneig en aquests pacients.<sup>43</sup>

A part d'utilitzar la categorització presentada fins al moment, en els casos en què es duen a terme monitoratges continuats, la càrrega de FA que presenta un individu es pot definir de forma quantitativa, utilitzant variables com la duració de l'episodi més llarg, el nombre d'episodis, o la proporció de temps que un individu es troba en FA.<sup>44</sup> Alguns estudis indiquen que la càrrega de FA podria estar relacionada amb el risc embòlic, però actualment aquesta relació no està ben caracteritzada ni se sap si existeix algun llindar per sobre del qual el risc augmenta.<sup>45,46</sup> Cal destacar també que la FA no és una malaltia estàtica i pot progressar amb el temps, de formes amb menys, a formes amb més, càrrega de FA.<sup>47</sup>

El tractament de la FA en general es basa en 3 pilars: la prevenció de l'ictus (amb tractament anticoagulant quan sigui necessari), el control dels símptomes (amb l'ús de medicaments i tècniques per controlar i restaurar el ritme i la freqüència cardíaca), i el control dels factors de risc cardiovasculars i malalties concomitants. En anglès, aquest enfoc integral rep el nom d'estratègia ABC: A de "*Anticoagulation/avoid stroke*", B de "*better symptom management*" i C de "*cardiovascular/comorbidities risk factor management*".<sup>37</sup> Pel que fa a la prevenció de l'ictus, els anticoagulants redueixen més d'un 60% el risc de patir un ictus, mentre que el tractament amb antiplaquetaris únicament redueix un 20% aquest risc.<sup>48</sup> Els antagonistes de la vitamina K van ser els primers anticoagulants utilitzats en pacients amb FA, però recentment, els anticoagulants orals d'acció directa (ACODs) han demostrat ser una bona alternativa. Aquests últims, a part de necessitar un control menys exhaustiu, han mostrat una major efectivitat i seguretat en la prevenció dels embolismes,<sup>49</sup> i una reducció del risc d'hemorràgia cerebral. De

totes maneres, el tractament amb anticoagulants comporta un risc intrínsec d'hemorràgia. És per aquest motiu que abans d'iniciar-lo es realitza una valoració del risc de cada pacient de forma individualitzada. Hi ha diferents factors que s'associen al risc tromboembòlic i la seva combinació ha generat escales d'estratificació del risc per tal d'identificar pacients candidats a teràpia anticoagulant. Les escales més usades actualment són les puntuacions CHADS<sub>2</sub> i la puntuació CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc (Taula 1).<sup>50,51</sup> Un CHADS<sub>2</sub>≥2 o un CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc ≥2 (o ≥3 en cas de dones) es considera d'alt risc i en aquests pacients es recomana el tractament anticoagulant.<sup>37</sup>

Factor de risc		Puntuació atorgada Escala CHADS <sub>2</sub>	Puntuació atorgada Escala CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc
<b>C</b>	Insuficiència cardíaca congestiva	1	1
<b>H</b>	Hipertensió	1	1
<b>A</b>	Edat ≥75 anys	1	2
<b>D</b>	Diabetis mellitus	1	1
<b>S</b>	Ictus/accident isquèmic transitori (AIT) previ	2	2
<b>V</b>	Malaltia vascular perifèrica	-	1
<b>A</b>	Edat 65-74 anys	-	1
<b>Sc</b>	Sexe femení	-	1
Puntuació màxima		6	9

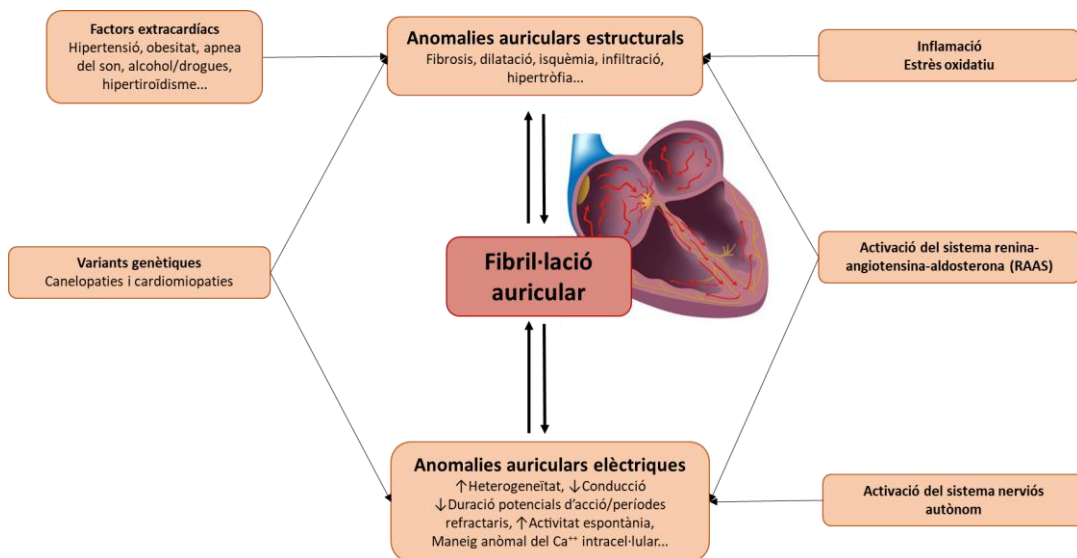
**Taula 1:** Escala CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc.

Les abreviacions de l'esquerre fan referència a les inicials en anglès dels diferents factors de risc que donen nom aquesta puntuació: C (congestive heart failure), H (hypertension), A (age≥75 years old), D (diabetes mellitus), S (stroke), V (vascular disease), A (age 65-74 years), Sc (sex category female).

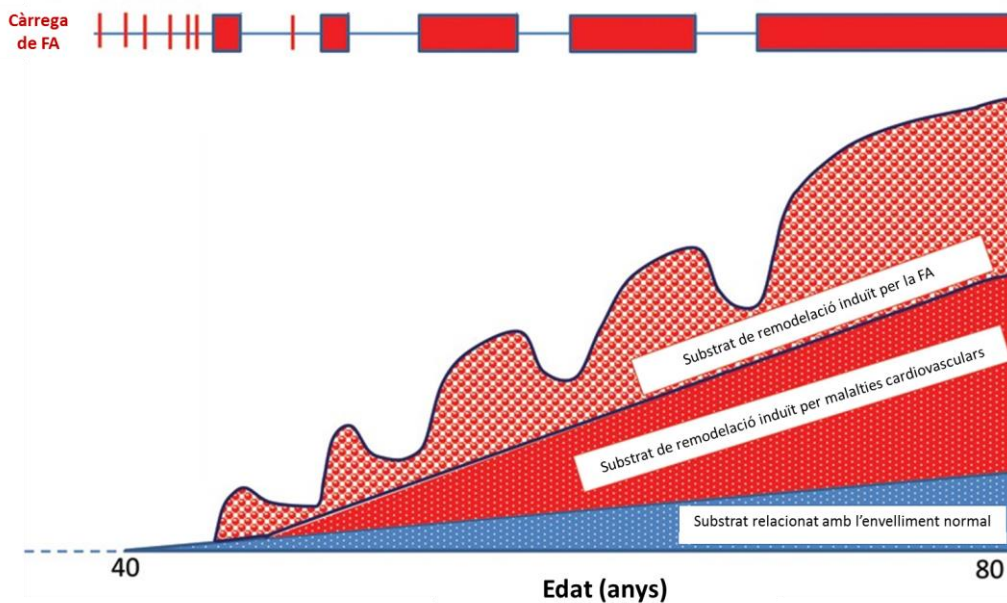
### 1.2.2. Fisiopatologia de la FA

La FA és una arrítmia complexa que es produeix quan anomalies estructurals i/o electrofisiològiques alteren el teixit auricular promovent la formació d'impulsos elèctrics i/o la seva propagació. Aquestes anomalies són causades per múltiples mecanismes patofisiològics. A més, la mateixa FA pot provocar un remodelat elèctric i estructural del cor de manera que la FA genera FA (concepte conegut en anglès com “*AF begets AF*”) (Figura 2).<sup>42</sup>

L'evolució de la malaltia és progressiva. En els pacients joves els casos de FA són escassos i predominen les causes genètiques de FA (com mutacions i variants genètiques en els canals iònics i de transport). Amb l'envelliment, les fonts focals i els substrats de reentrada esdevenen més importants i també augmenta la prevalença de la remodelació induïda per malalties cardiovasculars subjacents. A més, els episodis de FA generen més remodelació tot i que aquesta és parcialment reversible en cessar l'arrítmia (Figura 3).<sup>52</sup>



**Figura 2:** Mecanismes involucrats en el desenvolupament i manteniment de la FA (Adaptada de January et al, 2014).<sup>42</sup>



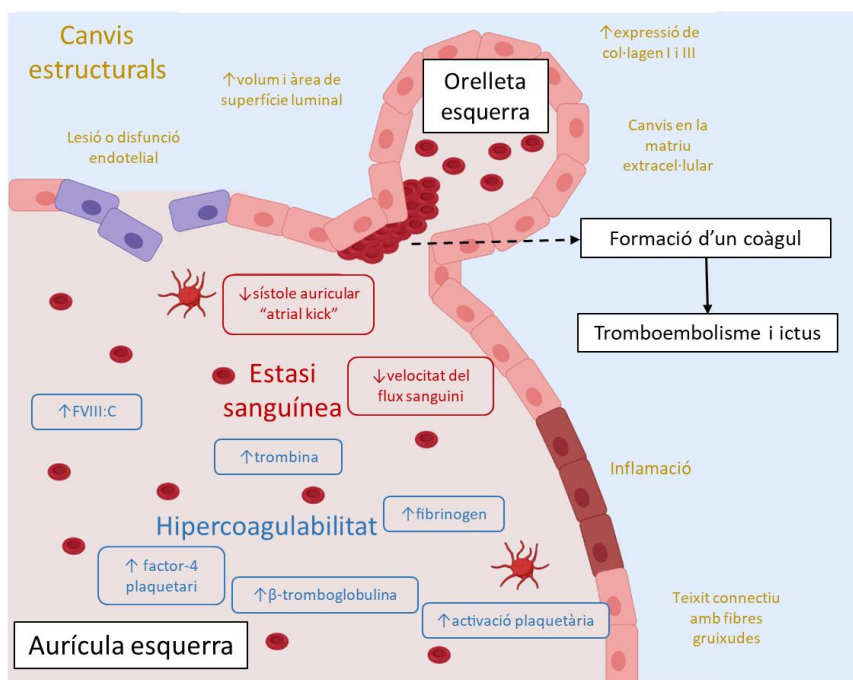
**Figura 3:** Història natural de la FA (Adaptada de Nattel et al, 2014).<sup>52</sup>



### 1.2.3. Relació entre la fibril·lació auricular i l'ictus

Els mecanismes fisiopatològics pels quals en els pacients amb FA es produeix un estat protrombòtic que predisposa a l'ictus es poden explicar amb l'anomenada tríada de Virchow. Fa més d'un segle Rudolf Virchow va descriure tres mecanismes principals involucrats en la formació de trombes que es poden aplicar en el context de la FA (Figura 3):<sup>53</sup>

- Anomalies en la circulació sanguínia: En la FA, l'absència de sistoles auriculars completes produeix una disminució de la velocitat del flux sanguini, anomenada estasi. L'estasi sanguínia facilita la formació de trombes a causa de l'agregació d'eritròcits i pot afectar l'activitat normal d'alguns components de la cascada de la coagulació.
- Anomalies en els components sanguinis: L'activació de la cascada de coagulació, una major reactivitat plaquetària, o una fibrinòlisi alterada poden produir un estat d'hipercoagulabilitat en la FA.
- Anomalies en les parets dels vasos: En la FA es produeixen canvis estructurals de l'aurícula que poden predisposar a l'estasi sanguínia. A més, també es produeix una disfunció endotelial que contribueix a l'estat protrombòtic.



**Figura 4:** Components de la tríada de Virchow que expliquen l'estat protrombòtic en la FA i la cardiomiopatia atrial (Adaptada de Yew Ding et al, 2020).<sup>53</sup>

Tots aquests mecanismes faciliten que es formin coàguls, especialment en l'aurícula esquerra i l'orelleta auricular esquerra, una estructura anatòmica en forma de sac que es troba en la paret de l'aurícula esquerra. El posterior desprendiment d'aquests coàguls i embolització a través de l'aorta cap a la circulació cerebral pot provocar un ictus de tipus cardioembòlic.

Per altra banda, en els últims anys, s'està qüestionant el paper de la FA en la causalitat de l'ictus, i s'està donant més pes a la hipòtesi que la FA podria ser un marcador d'una patologia subjacent anomenada cardiomiopatia atrial, que per si sola podria augmentar el risc a ictus a través d'alguns dels mecanismes mencionats anteriorment.<sup>54</sup> La dissociació temporal entre els episodis de FA i l'aparició d'ictus dona suport a aquesta teoria.<sup>55,56</sup> La cardiomiopatia atrial es defineix com qualsevol canvi en l'estructura, arquitectura o contractilitat de l'aurícula amb el potencial de produir manifestacions clíniques rellevants.<sup>57</sup> Tot i que actualment no existeix un criteri estàndard per diagnosticar la cardiomiopatia atrial, es poden utilitzar varies tècniques i marcadors per avaluar-ne la presència. Algunes metodologies proposades són el ECG, amb paràmetres com la força terminal de la ona P en la derivació V1 anormal (PTFV1, de l'anglès *P-wave terminal force in lead V1*) o la presència de taquicàrdies supraventriculars paroxístiques; la evaluació ecocardiogràfica de l'aurícula esquerra, amb paràmetres com el volum, el diàmetre o el *strain* auricular; el mapatge del voltatge cardíac; els biomarcadors sanguinis, o la ressonància magnètica cardíaca.<sup>58,59</sup>

#### 1.2.4. Infart cerebral silent i FA

Els IS es defineixen com infarts cerebrals detectats de forma casual en proves de neuroimatge en absència de símptomes neurològics referits a la zona corresponent. Segons estudis epidemiològics, s'estima que la prevalença d'aquestes lesions en la població general és d'entre el 10-20%, i la seva presència s'ha relacionat amb un augment del risc d'ictus simptomàtic, així com de deteriorament cognitiu, alteracions psiquiàtriques i mortalitat. Per aquest motiu, els IS es podrien considerar com un factor de risc, o una manifestació inicial de la malaltia cerebrovascular, en lloc d'una troballa incidental.<sup>60,61</sup>

La prevalença de IS en pacients amb FA és major en comparació a la de pacients sense FA, i per tant, la FA s'ha proposat com una possible causa de IS. Dades d'una revisió sistemàtica i metanàlisis incloent 9 estudis mostren que la presència de FA s'associa de forma independent al risc de IS, independentment del tipus de FA (paroxística, persistent o permanent).<sup>62</sup> A més, un percentatge significatiu de pacients amb FA i baix risc embòlic segons les escales CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc/CHADS<sub>2</sub> presenten IS si s'avaluen amb una RM d'alt camp (3T).<sup>63</sup>

Els IS s'han proposat també com un dels mecanismes rere l'associació que sembla haver-hi entre la demència o deteriorament cognitiu i la FA.<sup>64</sup> De tota manera, també podrien existir altres mecanismes com els canvis en la perfusió cerebral o la inflamació sistèmica.<sup>65</sup>

### 1.2.5. Cribratge de fibril·lació auricular. Estratègies de prevenció primària

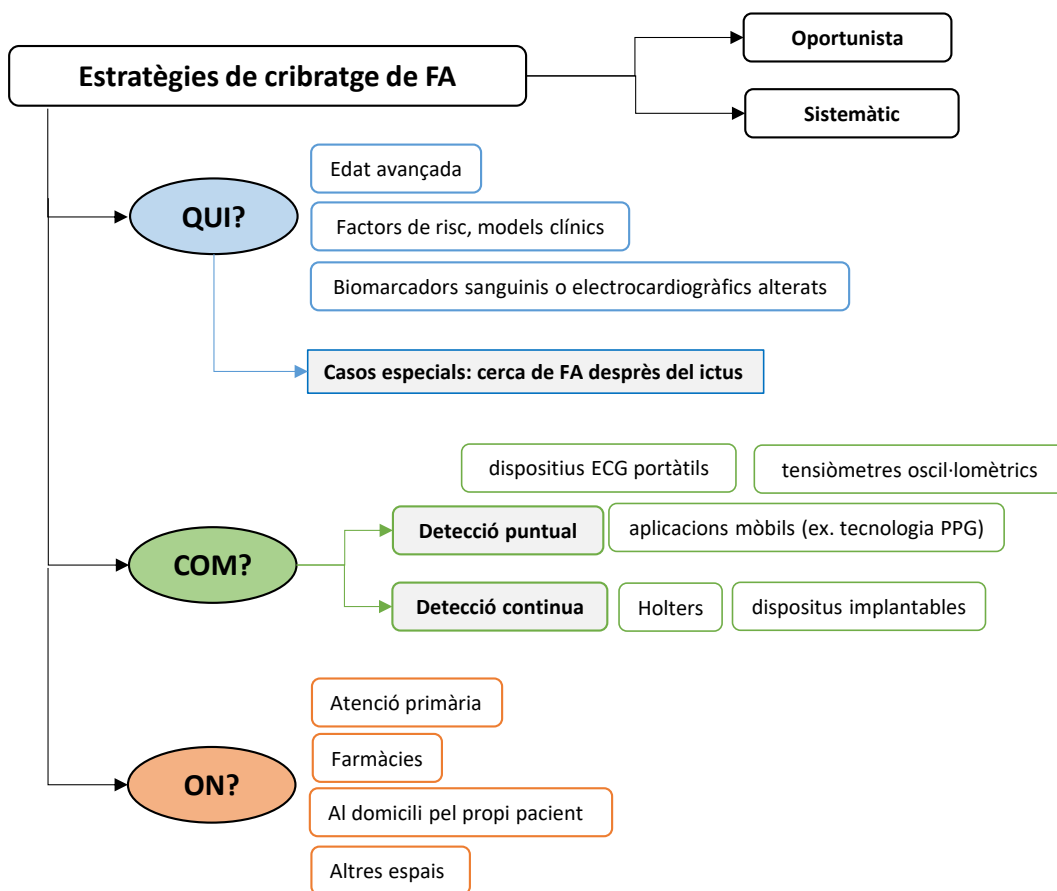
La detecció de FA abans que es produeixi cap símptoma i/o complicació permetria iniciar tractaments preventius amb el potencial de reduir ictus i morts. Estratègies de cribratge poblacional permetrien augmentar les taxes de detecció en aquesta fase prèvia. De fet, la FA compleix la majoria de criteris definits per la OMS que justifiquen la realització d'un cribratge: es tracta d'un important problema de salut públic, existeix un tractament, presenta una fase asimptomàtica, i existeixen tècniques per al seu diagnòstic acceptables per part de la població.<sup>66</sup>

Hi ha dos tipus de cribratge:

- El cribratge oportunista s'ofereix per part dels professionals sanitaris durant consultes de rutina no relacionades amb la FA.
- El cribratge sistemàtic es dirigeix de forma generalitzada a una població completa o subgrup d'una població. El reclutament de pacients es pot realitzar a través d'invitacions dirigides o campanyes publicitàries.

S'han proposat i testat varies estratègies de cribratge en diferents poblacions, però segueix sense existir un consens clar sobre quina és la millor aproximació.<sup>66,67</sup> Actualment, l'ESC recomana el cribratge oportunista en aquells pacients majors de 65 anys i declara que el cribratge sistemàtic es pot considerar en aquells pacients majors de 75 anys.<sup>37</sup> Per contra, la USPSTF (de l'anglès *United States Preventive Services Task Force*) considera que no hi ha suficient evidència per recomanar un cribratge a la població major de 65 anys.<sup>68</sup> Actualment, doncs, tot i l'existència d'una conscienciació generalitzada entre els professionals de la salut i altres actors claus de la necessitat d'aplicar programes de cribratge, la implementació d'aquests en els països europeus és gairebé nul·la.<sup>69</sup> Algunes qüestions fonamentals com quin o quins dispositius utilitzar, a qui dirigir el cribratge i on realitzar-lo no estan resoltes (Figura 5).<sup>70,71</sup> Durant els últims anys han sorgit un gran ventall de dispositius i eines diagnòstiques que permeten la detecció de la FA.<sup>72</sup> Els dispositius més econòmics i senzills d'usar, alguns fins i tot pel mateix pacient, són aquells que permeten la detecció puntual de la FA mitjançant tècniques electrocardiogràfiques, o altres tecnologies com l'oscil·lometria o la fotopletismografia (PPG). Per altra banda, es poden realitzar monitoratges electrocardiogràfics prolongats amb dispositius no-invasius o implantables. La

detecció de casos de FA depèn de l'estratègia de cribatge escollida, en concret, la capacitat de diagnòstic augmenta amb la duració del monitoratge i la seva freqüència.<sup>73</sup> A més, la selecció d'una població d'alt risc en la que la incidència de FA és major permetria optimitzar la relació cost-benefici d'un cribatge. En aquest sentit, alguns grups han desenvolupat models clínics per identificar pacients amb alt risc de FA.<sup>74,75</sup> Altres eines com l'ús de biomarcadors sanguinis o electrocardiogràfics podria ser útil per seleccionar poblacions "enriquides" amb FA.



**Figura 5:** Representació dels punts principals del cribatge de FA. PPG: fotopletismografia.

Per últim, l'efectivitat de les diferents estratègies de cribatge, no només en la detecció de FA, sinó en la prevenció d'ictus isquèmics no està clara. En aquest sentit, recentment s'han publicat els resultats dels seguiments de dos grans estudis aleatoritzats que testaven dues propostes de cribatge: el STROKESTOP, i el LOOP. En els dos estudis, les taxes de FA i les prescripcions d'anticoagulants van ser majors en el grup en el qual s'oferia el cribatge en comparació al grup

control. Tanmateix, tot i que en el STROKESTOP es va demostrar un benefici net en el seguiment si es tenia en compte la mortalitat, el nombre d'ictus isquèmics, hemorràgies, i hospitalitzacions de forma conjunta, cap de les dues estratègies de cribatge va poder demostrar una reducció en el risc d'ictus i embolismes sistèmics en comparació al grup control.<sup>76,77</sup> S'espera que l'estudi SAFER tingui prou potència estadística per resoldre aquesta qüestió (Taula 2).<sup>78</sup>

Estudi	Mostra	Disseny	Criteris d'inclusió	Intervenció	Resultats (endpoint principal)
STROKESTOP <sup>76</sup>	N=28768	1:1	75/76 anys	ECG puntuals dos cops al dia durant 14 dies	Ictus o embolisme arterial (HR 0.80 [95% CI 0.61–1.05]; p=0.11)
LOOP <sup>77</sup>	N=6004	1:3	70-90 anys + hipertensió, diabetis, insuficiència cardíaca o ictus previ	Monitoratge continu amb un dispositiu implantable durant 3 anys	Mortalitat, ictus, hemorràgies o embolisme arterial (HR 0.96 [95% CI 0.92–1.00]; p=0.045)
SAFER <sup>78</sup>	N=126000	1:2	≥75 anys	ECG puntuals quatre cops al dia durant 3 setmanes	En marxa

**Taula 2:** Resum dels principals assaigs clínics testant estratègies de cribatge de FA.

A part de totes les qüestions comentades fins al moment, a l'hora d'implementar un programa de cribatge, també existeixen diferències poblacionals. Cal destacar, que en la nostra comunitat, més enllà d'algunes campanyes promovent la detecció de FA,<sup>79</sup> no s'ha testat cap altra estratègia de cribatge.

### 1.2.6. Cerca de fibril·lació auricular després d'un ictus. Estratègies de prevenció secundària

La cerca d'una possible FA oculta és especialment important després de patir un ictus o AIT, ja que la FA asimptomàtica és una de les causes ocultes més freqüents en els pacients amb ictus criptogènic/ESUS. Depenent de la tecnologia utilitzada, les taxes de detecció de FA en aquests pacients varien, arribant a taxes de fins al 30% amb monitoratges cardíacs prolongats, com va demostrar l'estudi CRYSTAL-AF.<sup>80,81</sup> La detecció de FA després d'un ictus és rellevant per la seva

prevenció secundària, fins i tot si hi ha dubtes sobre si es tracta de la causa probable del ictus índex. Molts dels punts comentats en l'apartat anterior són també aplicables en la cerca de FA després del ictus. Actualment, en les guies clíniques nacionals i internacionals es recomana el seguiment electrocardiogràfic dels pacients amb ictus criptogènic. No obstant, a part de la realització d'un ECG basal, no existeix un consens entre guies pel que fa a la duració i el tipus de monitoratges, així com a quins pacients s'haurien d'adreçar seguiments més prolongats.<sup>82</sup> Les indicacions més completes són per part de la ESC, que recomana un monitoratge mínim de 24 hores, prolongable sempre que sigui possible a 72 hores en tots aquells pacients amb ictus o AIT sense FA coneguda. També considera que seguiments més llargs amb dispositius implantables o monitors ECG no invasius es podrien considerar en pacients seleccionats.<sup>37</sup> Quina és la millor manera de seleccionar aquests pacients no està clara. Alguns paràmetres ecocardiogràfics (ex. volum de l'aurícula esquerra o funció auricular), marcadors electrocardiogràfics (ex. excés d'activitat ectòpica supraventricular), o l'increment dels nivells d'alguns biomarcadors sanguinis (ex. pèptids natriurètics) prediuen la presència de FA i s'han proposat com a eines que podrien guiar la selecció de pacients a monitorar de forma prolongada després d'un ictus.<sup>82</sup> A més, per tal d'agilitzar l'anàlisi dels registres de ECG, existeixen eines que permeten analitzar de forma automatitzades els monitoratges electrocardiogràfics continus com és el cas de la eina SRA (de l'anglès *Stroke Risk Analysis*). Aquesta eina s'està començant a implementar en alguns hospitals, i, a part de permetre la detecció de FA, també utilitza algorismes de *machine learning* per realitzar una estratificació del risc segons el anàlisi del registre de ECG, sent capaç de predir casos amb alt risc de FA.<sup>83</sup>

Per altra banda, la generalització dels monitoratges prolongats no està demostrada. De fet, l'estudi MonDAFIS, que comparava el monitoratge continu durant 7 dies versus els procediments diagnòstics habituals en unitats d'ictus alemanyes, va obtenir resultats neutres pel que fa a les taxes d'anticoagulació i reducció d'ictus.<sup>84</sup>

### 1.3. Biomarcadors sanguinis en l'ictus

Un biomarcador es defineix com una característica mesurable de forma objectiva indicadora d'un procés biològic normal o patogènic, o de resposta biològica a una intervenció, o exposició. En el concepte de biomarcador s'engloben característiques fisiològiques, histològiques, anatòmiques, radiogràfiques o moleculars, entre d'altres.<sup>85</sup> Els biomarcadors moleculars, sovint de naturalesa proteica, es poden mesurar en múltiples matrius biològiques, com pot ser la sang, el líquid cefaloraquídi, lisats cel·lulars... En la present tesi ens centrarem en l'estudi de

biomarcadors en sang, de gran interès gràcies a la seva accessibilitat. Per tant, d'aquí en endavant, ens referirem a aquest tipus quan parlem de biomarcadors.

Els biomarcadors sanguinis s'utilitzen en la pràctica clínica de moltes malalties, però, de moment, no s'ha implementat el seu ús en el maneig de l'íctus. Malgrat això, l'estudi dels biomarcadors en el marc de l'íctus ha crescut en els últims anys i s'han proposat alguns candidats que es podrien usar durant el curs de la malaltia en un futur pròxim. En aquest context, algunes de les indicacions més importants en les que els biomarcadors podrien ser útils són el diagnòstic de l'íctus i la seva diferenciació d'altres patologies amb símptomes clínics similars (*mimics*), la diferenciació dels ictus isquèmics i hemorràgics, la classificació etiològica, i la predicció del pronòstic i complicacions dels pacients, entre d'altres.<sup>86,87</sup> Tot i que per algunes d'aquestes utilitats l'ús dels biomarcadors és encara preliminar, el diagnòstic etiològic, en el qual ens centrarem més endavant, és potser una de les indicacions en la que s'està més a prop d'aconseguir la translació a la pràctica clínica, amb alguns assajos clínics en marxa que utilitzen els pèptids natriurètics.

Un bon biomarcador cal que tingui una bona capacitat predictiva. Aquesta es pot mesurar en termes de sensibilitat (la capacitat d'identificar els positius veraders, és a dir, aquells que pateixen la malaltia o indicació en qüestió), i especificitat (la capacitat d'identificar els negatius veraders, és a dir, aquells que no han desenvolupat la malaltia o indicació). L'objectiu és obtenir valors alts dels dos paràmetres, però sovint, ambdues característiques no són assumibles per a un sol marcador, i és per això, que l'agrupació de dos o més marcadors en panells pot millorar els resultats de biomarcadors individuals.<sup>88</sup> A més depenent del ús previst del biomarcador en qüestió, serà prioritari comptar amb valors alts de sensibilitat o especificitat. Per exemple, en el cas de la FA, un biomarcador amb alta sensibilitat permetria seleccionar pacients en els que col·locar un dispositiu Holter, mentre que un biomarcador amb alta especificitat es podria utilitzar per indicar un tractament anticoagulant.

### 1.3.1. Biomarcadors d'etiologia de l'íctus

Com s'ha comentat anteriorment, l'íctus és una patologia heterogènia i la correcta identificació etiològica té conseqüències en les estratègies de prevenció secundària per evitar recurrències. Ja que els processos fisiològics i el substrat patològic varia entre els subtipus d'íctus, els biomarcadors tenen potencial per millorar la classificació etiològica dels pacients. En aquest sentit, s'han explorat diferents biomarcadors amb relació a les principals categories d'íctus isquèmic.

En el cas de l'íctus cardioembòlic, els pèptids natriurètics, marcadors de l'estrès cardíac, són els candidats més estudiats i en parlarem en profunditat en la pròxima secció. Altres proteïnes també s'han associat a l'íctus cardioembòlic i a la presència de FA, com poden ser altres marcadors de dany cardíac, de dany endotelial, inflamatoris o de coagulació, entre d'altres (Taula 3).<sup>89</sup> A més, l'ús d'alguns d'aquests biomarcadors, relacionats amb la FA, poden ser útils en el context de la prevenció primària i el seu rol s'ha estudiat amb relació a la incidència de FA en pacients asimptomàtics.<sup>90</sup>

Funció	Biomarcador
Dany cardíac/estrès miocardi	Pèptids natriurètics: NT-proBNP, BNP, MR-proANP <sup>91,92</sup> Troponines <sup>93,94</sup>
Inflamació	CRP <sup>95</sup> Citoquines inflamatòries: IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ <sup>96</sup>
Coagulació	D-dimer <sup>97,98</sup> vWF <sup>99</sup>
Disfunció endotelial	sRAGE <sup>97</sup>

**Taula 3:** Funcions i exemples d'alguns dels biomarcadors proteics més estudiats en relació a l'íctus cardioembòlic i la fibril·lació auricular.

Per altra banda, per l'íctus aterotrombòtic s'han proposat alguns marcadors inflamatoris associats a la aterosclerosi com la fosfolipasa A2 associada a la lipoproteïna (Lp-PLA2) <sup>100</sup>, o la lipoproteïna a (Lp(a)).<sup>101</sup>

A part de marcadors proteics, en els últims anys, i gràcies a les tècniques òmiques, s'han començat a explorar altres molècules mesurables en sang com poden ser els RNA circulants.<sup>86</sup> En aquest sentit, alguns estudis de transcriptòmica han proposat panells d'expressió de RNA que inclouen desenes de gens per identificar la causa més probable d'íctus.<sup>102,103</sup>

A més, gràcies als estudis d'associació del genoma complet (GWAS, de l'anglès *genome wide association studies*) també s'han identificat variants gèniques de risc associades al íctus, i en concret a algunes etiologies. En aquest sentit, l'estudi GWAS més gran realitzat fins al moment és el de la iniciativa MEGASTROKE. En aquest estudi es van identificar 32 loci de risc a íctus, dels



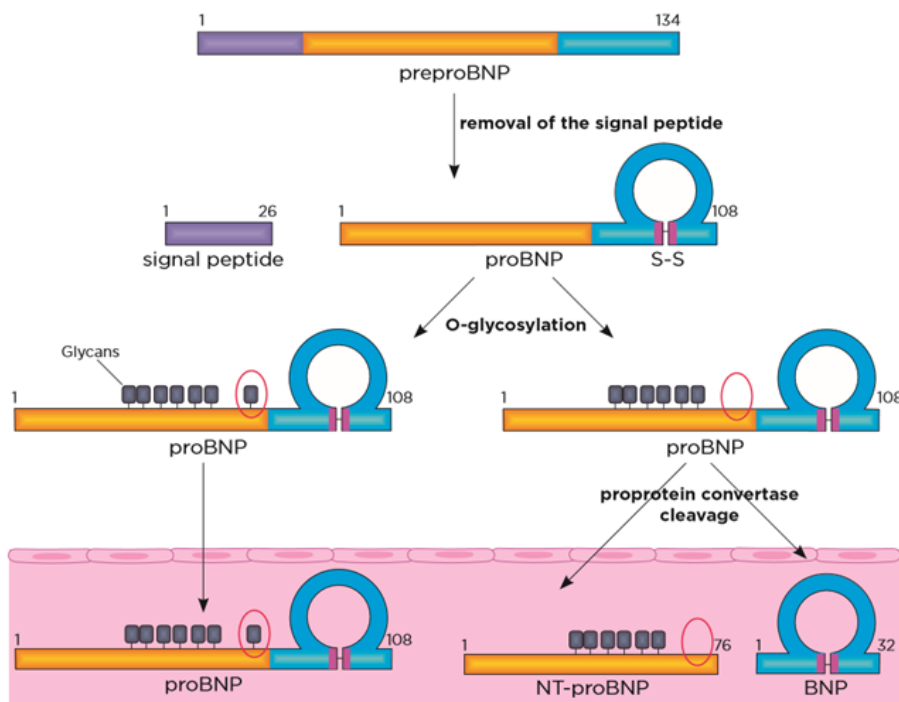
quals 22 van ser descrits de novo, i es van confirmar alguns loci associats a l'etiologia cardioembòlica com el de *PITX2*.<sup>104</sup>

### 1.3.1.1 L'exemple dels pèptids natriurètics

Els pèptids natriurètics són hormones cardíaques que regulen l'homeòstasi dels fluids corporals i són secretades en resposta a un augment de la pressió i el volum sanguini. Tenen funcions natriurètiques, diürètiques i vasodilatadores. Existeixen tres tipus de pèptids natriurètics: el pèptid natriurètic auricular o tipus A (ANP), el pèptid natriurètic tipus B (BNP), i el pèptid natriurètic tipus C (CNP). Els tres comparteixen una estructura comuna en forma d'anell de 17 aminoàcids. ANP i BNP són sintetitzats pels cardiomiòcits en resposta a l'estirament mecànic de les cavitats cardíaques i passen a la circulació sanguínia per actuar en diversos teixits. ANP té una síntesi principalment auricular, i BNP ventricular, però en condicions patològiques els dos pèptids es poden alliberar en qualsevol de les dues cambres. ANP s'emmagatzema en forma de grànuls i s'allibera en resposta a desencadenants menors com pot ser l'exercici, mentre que BNP té un emmagatzematge mínim en grànuls i se sintetitza i allibera en pics quan és necessari. Per altra banda, CNP es produeix principalment en les cèl·lules endotelials tot i que també pot ser sintetitzat pel teixit miocardiàc.<sup>105,106</sup>

Els pèptids natriurètics i els seus derivats s'han explorat àmpliament com a biomarcadors cardíacs, especialment el cas de BNP. Aquest se sintetitza en forma de proBNP i, després de l'escissió d'un pèptid senyal, es converteix en proBNP. Durant la seva maduració, proBNP pateix modificacions posttraduccionals en forma de O-glicosilacions en 9 regions fins ara identificades. Seguidament, mitjançant l'enzim furina, es produeix l'escissió proteolítica de proBNP en BNP i la seva regió N-terminal biològicament inactiva, que rep el nom de NT-proBNP. La presència de residus glicosilats prop del lloc d'escissió de proBNP podria afectar-ne el processament. Finalment, BNP i NT-proBNP s'alliberen en quantitats equimolars al torrent sanguini junt amb porcions no processades del seu precursor proBNP. BNP té una vida mitjana de 20 minuts mentre que la vida mitjana de NT-proBNP és d'aproximadament 1-2 hores, i per tant, la quantitat de NT-proBNP circulant és 5 vegades major a la de BNP (Figura 6).<sup>106-108</sup> Actualment, i seguint les guies clíniques, es recomana l'ús de BNP o el seu derivat NT-proBNP com a part del circuit diagnòstic de la insuficiència cardíaca i el seu seguiment.<sup>109</sup> Per altra banda, l'increment dels nivells de BNP i NT-proBNP s'ha relacionat amb l'etiologia cardioembòlica del ictus isquèmic i existeix literatura sobre el seu potencial ús en ictus criptogènics.<sup>91,110,111</sup> De forma similar, l'augment d'aquests biomarcadors s'ha descrit amb relació a la incidència i la recurrència de la FA. Per últim, en

pacients amb FA, NT-proBNP s'ha proposat com un marcador útil per predir el risc d'ictus i episodis embòlics com a part de l'escala de risc ABC (de l'anglès "age, biomarkers and clinical history").<sup>112</sup>



**Figura 6:** Esquema del processament de BNP i NT-proBNP.<sup>113</sup>

Actualment estan en marxa dos assajos clínics aleatoritzats que pretenen testar si els pacients amb alts nivells de pèptids natriurètics, i sense FA, també es beneficiarien del tractament amb anticoagulants, de forma similar a com ho fan els pacients amb FA registrada. Per una banda, el ARCADIA inclou pacients amb ESUS de més de 45 anys amb cardiomiopatia atrial definida per algun dels següents criteris: NT-proBNP >250 pg/ml, PTFV1 >5000  $\mu\text{V} \times \text{ms}$ , o diàmetre de l'aurícula esquerra >3 cm/m<sup>2</sup>.<sup>114</sup> En canvi, en l'estudi MOSES, s'inclouen pacients isquèmics de qualsevol etiologia, amb l'únic criteri que tinguin nivells elevats de MR-proANP (Taula 4).<sup>115</sup>

Estudi	Inclusió estimada	Criteris d'inclusió	Intervenció
ARCADIA <sup>114</sup>	N=1100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 45</math> anys</li> <li>• <math>mRS \leq 4</math></li> <li>• Diagnòstic clínic d'ictus isquèmic tipus ESUS</li> <li>• <math>&gt;3</math> i <math>&lt;180</math> dies després del ictus                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cardiomiopatia atrial definida com:                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>○ NT-proBNP <math>&gt;250</math> pg/ml o</li> <li>○ PTFV1 <math>&gt;5000</math> <math>\mu V \times ms</math>,</li> <li>○ Diàmetre de l'aurícula esquerra <math>&gt;3</math> cm/m<sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	1:1 Apixaban vs aspirina
MOSES <sup>115</sup>	N=590	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 18</math> anys</li> <li>• Diagnòstic d'ictus isquèmic</li> <li>• MRproANP <math>\geq 200</math> pg/l en les primeres 24 hores després de l'inici dels símptomes</li> </ul>	1:1 ACOD (dabigatran, apixaban, endoxaban) vs antiplaqueri (aspirina o clopidogrel)

**Taula 4:** Resum dels principals assaigs clínics testant l'ús de peptids natriurètics per guiar la teràpia anticoagulant en pacients amb ictus

### 1.3.2. Procés de descobriment de nous biomarcadors

En el context de l'etiologia de l'ictus, tot i el gran nombre de biomarcadors proposats fins al moment, cap té una capacitat predictiva prou bona per ser implementat a la pràctica clínica. És per aquest motiu que els estudis orientats a la identificació de nous candidats són necessaris. El procés de descobriment de nous biomarcadors consta normalment de quatre fases: descobriment, quantificació, verificació i validació.<sup>116</sup> En cada una d'aquestes fases es redueix el nombre de candidats mentre s'augmenta la grandària de la mostra utilitzada (Figura 7).

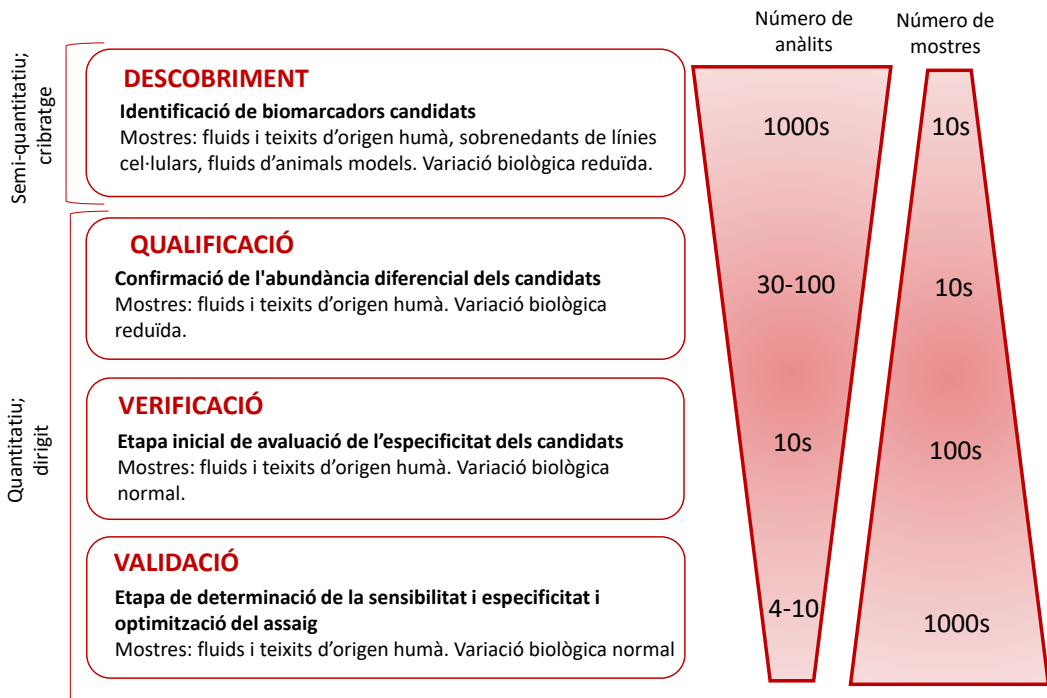
En la fase de descobriment es poden fer servir sistemes model (models animals o línies cel·lulars), o mostres biològiques humanes. En aquesta fase es realitza una comparació binària simplificada entre mostres amb el procés estudiat i sense. Per tal d'evitar el "soroll" per part d'altres malalties o factors de confusió, les mostres dels dos grups haurien de ser tan semblants com sigui possible, idealment diferint únicament respecte a la condició d'interès. En aquesta fase normalment s'utilitzen tècniques de cribratge massiu, també conegudes com a tècniques òmiques, que varien en funció del tipus de molècula estudiada. Per exemple, els estudis de transcriptòmica es concentren en l'estudi del perfil d'expressió gènica, considerant les molècules de RNA circulants (codificants o no codificants) com a biomarcadors potencials. En aquest sentit, les principals tècniques que s'usen per la detecció simultània de grans quantitats de transcrits són els

*microarrays* o tecnologies tipus xip, la seqüenciació de RNA (RNA-seq), i la PCR quantitativa multiplexada. Per altra banda, l'estudi de possibles biomarcadors proteics es pot realitzar amb tècniques de proteòmica com l'espectrometria de masses, o l'ús d'*arrays* de proteïnes que exploren una part del proteoma.<sup>117</sup> En aquest sentit, diferents companyies han desenvolupat panells o matrius d'anticossos que permeten detectar fins a centenars de proteïnes simultàniament en la mateixa mostra amb tecnologies derivades de la tècnica ELISA (de l'anglès *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). També s'han desenvolupat noves tècniques mixtes, que utilitzen parelles d'anticossos units a sondes de DNA. La hibridació, amplificació i quantificació d'aquestes sondes per tècniques de PCR quantitativa (qPCR) o NGS (de l'anglès *Next Generation Sequencing*) en cas que els anticossos reconeguin la proteïna objectiu és el mecanisme rere l'assaig d'extensió per proximitat (PEA, de l'anglès *proximity extension assay*) desenvolupat per la companyia Olink.<sup>118</sup> Finalment, una alternativa als anticossos és la tecnologia basada en aptàmers. Aquests són àcids nucleics de cadena senzilla que posseeixen una estructura tridimensional particular que els permet reconèixer i unir-se amb alta afinitat a molècules diana. Gràcies a aquesta tecnologia, l'assaig Somascan® pot reconèixer milers de proteïnes en una sola mostra.<sup>119</sup>

Independentment de la tècnica utilitzada, com a resultat de la fase de descobriment s'obtenen llistats de molècules amb expressió diferencial entre els casos i els controls. En aquest punt parlem de biomarcadors candidats, ja que sovint inclouen gran quantitat de falsos positius que cal descartar en fases posteriors. Les llistes de candidats derivades d'estudis de descobriment es poden suplementar o substituir per candidats extrets de la literatura o provinents d'altres estudis de descobriment.

La fase de qualificació permet confirmar els resultats obtinguts durant la fase de descobriment per mitjà de tècniques analítiques diferents de les utilitzades en la fase anterior. A partir d'aquest punt, s'utilitzen principalment tècniques dirigides als candidats en estudi; per exemple, ELISA o Western blot en el cas de proteïnes, o qPCR en el cas de biomarcadors de RNA.

Durant la fase de verificació el nombre de mostres estudiades augmenta per tal de plasmar la variabilitat ambiental, genètica i estocàstica de la població estudiada.



**Figura 7:** Procés de descobriment de nous biomarcadors (Adaptat de Rifai et al, 2006).<sup>116</sup>

Finalment, en la fase de validació només s'inclouen un nombre reduït de candidats que han superat amb èxit la fase anterior. En aquesta fase s'avaluen els candidats per mitjà de tècniques optimitzades en grans cohorts que reflecteixin a la perfecció la variabilitat i heterogeneïtat del conjunt de la població. Els candidats que finalment siguin validats poden ser seleccionats per la seva comercialització, fet que implica el refinament i perfeccionament dels mètodes de detecció per assolir els requeriments estàndards dels tests clínics actuals. Idealment, la integració en sistemes d'immunoassaigs automatitzats ja posats a punt en laboratoris clínics, o l'ús de tècniques ràpides de mesura com poden ser els dispositius POC (de l'anglès *Point of Care*) facilitaria la translació a la pràctica clínica de nous biomarcadors.



## 2.OBJECTIUS



L'objectiu general d'aquesta tesi és identificar **biomarcadors sanguinis de fibril·lació auricular com etiologia del ictus isquèmic**, i descriure la seva aplicació en diferents contextos de prevenció primària i secundària del ictus.

Els objectius específics són els següents:

1. Identificar nous biomarcadors de detecció de fibril·lació auricular (FA), així com estudiar la utilitat d'altres prèviament descrits en la bibliografia, en el context d'un programa de cribatge com a estratègia de prevenció primària del ictus.
2. Comparar de forma directa el comportament i utilitat dels pèptids natriurètics BNP i NT-proBNP en una cohort de ictus criptogènics, com a eina per predir la fibril·lació auricular paroxística.
3. Identificar noves proteïnes i vies fisiopatològiques alterades en pacients amb ictus criptogènic i fibril·lació auricular o cardiomiopatia auricular.
4. Avaluar en diferents etapes de la FA, el potencial us clínic de panells de biomarcadors que incloguin proteïnes de varies vies involucrades en la fisiopatologia d'aquesta arrítmia.







## 3.MÈTODES



La present tesi s'ha realitzat utilitzant mostres de sang de pacients de 3 cohorts. En aquest apartat oferim una breu descripció d'aquestes cohorts així com un resum de les tècniques utilitzades que pugui servir com a referència. La descripció detallada dels mètodes utilitzats es pot consultar en cada una de les publicacions que componen la secció de resultats.

### 3.1. Estudi AFRICAT

L'estudi AFRICAT (Atrial Fibrillation Research In CATalonia)<sup>120</sup> és un estudi poblacional, observacional i prospectiu amb l'objectiu de crear i aplicar un programa de cribatge de FA seqüencial a Catalunya, integrant informació clínica, electrocardiogràfica i biològica.

L'estudi es va dividir en dues fases: Fase I (2016-2017) i Fase II (2019-2020) i va incloure pacients de 65 a 75 anys amb hipertensió i diabetis de 3 àrees geogràfiques catalanes (SAP Muntanya, SAP Reus i SAP Terres de l'Ebre). Els criteris d'exclusió eren: malalties inflamatòries cròniques, càncer actiu, demència o FA prèvia (només en la Fase II). Els pacients s'identificaven a través dels registres clínics de tres àrees de salut catalanes (SAP Muntanya, SAP Reus, i SAP Terres de l'Ebre), i se'ls convidava a participar en l'estudi. Aquells pacients que acceptaven se'ls citava a una visita presencial en la que es realitzaven els següents procediments:

- Avaluació clínica amb registre de variables demogràfiques, factors de risc vascular, medicació, comorbiditats i constants vitals.
- Electrocardiograma de 12 derivacions.
- Dispositius ràpids de detecció de FA: AliveCor (només fase I),<sup>121</sup> Fibricheck (només fase II),<sup>122</sup> MyDiagnostick,<sup>123</sup> i WatchBP.<sup>124</sup>
- Col·locació d'un dispositiu Holter tèxtil (Nuubo™) i instruccions de com portar-lo durant un mes.
- Extracció de mostra de sang.

En total es van incloure 100 pacients en la Fase I i 259 en la fase II. D'aquests alguns es van haver d'excloure de l'estudi dels biomarcadors per manca de mostres de sang o monitoratges curts quedant-nos amb 96 pacients en la primera fase (20 FA i 76 no FA) i 178 en la segona fase (14 FA i 164 no FA). En els **articles 1, 2 i 5** utilitzem pacients de la cohort AFRICAT.

### 3.2. Estudi CRYPTO-FA

L'estudi CRYPTO-FA<sup>125,126</sup> és un registre prospectiu multicèntric de pacients amb ictus criptogènics majors de 55 anys. El registre es va realitzar entre 2015 i 2017 i hi van participar les

unitats d'ictus de 4 centres espanyols (Vall d'Hebrón, Hospital Virgen Macarena, Hospital Virgen del Rocío i Hospital universitari de Valladolid). Abans d'entrar a l'estudi tots els pacients havien de rebre una avaluació diagnòstica completa incloent proves de neuroimatge (RM o TC), ECG, estudi de les artèries intra- i extra-cranials (ecogràfic, angio-TAC o angio-RM), ecocardiograma transtoràcic, i monitoratge electrocardiogràfic continu hospitalari. Els criteris d'exclusió de l'estudi eren: diagnòs previ de FA (fins i tot aquells casos detectats durant l'estada hospitalària) o qualsevol altre causa coneguda d'ictus, portadors de marcapassos, discapacitat severa després de l'ictus (escala de Rankin modificat mRS>3), o empitjorament clínic. Un cop inclosos i durant les primeres 72 hores després de l'ictus es realitzava una extracció de sang i la col·locació d'un dispositiu Holter tèxtil (Nuubo™) durant un mes per detectar casos de FA.

En aquest període es van avaluar 320 pacients amb ictus criptogènics dels quals 296 es van incloure en el registre CRYPTO-AF. Després de l'exclusió d'aquells amb registres incomplets o sense disponibilitat de mostres, ens quedem amb 218 pacients (50 FA i 168 no FA). Aquests o un subgrup d'aquests són els que utilitzem en els **articles 3, 4 i 5**.

### 3.3. Estudi PARIAS

L'estudi PARIAS (**P**acientes con **A**ltísimo **R**iesgo de **I**ctus **A**gudo en **S**evilla)<sup>63</sup> és un estudi observacional en el que es van incloure pacients diagnosticats amb FA no-valvular de més de 50 anys i una puntuació CHADS<sub>2</sub>≤1. L'estudi es va dur a terme amb pacients de la zona urbana de Sevilla seleccionats entre el febrer i el maig de 2015 de la base de dades electrònica de salut d'Andalusia (DIRAYA). Els pacients amb història prèvia d'ictus o AIT, estenosis carotídia coneguda o cirurgia carotídia, història mèdica de qualsevol malaltia neurològica o càncer, contraindicació en la realització d'una RM cerebral, o tractament anticoagulant van ser exclosos.

Després de la inclusió, es programava amb els pacients una RM cerebral de 3 Teslas. En la mateixa visita es registraven dades demogràfiques i de la història mèdica del pacient (edat, sexe i factors de risc vascular entre d'altres) i es recollien mostres de sang. En un subgrup de pacients de l'estudi PARIAS, es va realitzar un estudi neuropsicològic en la que es va utilitzar el qüestionari MoCA versió espanyola.<sup>127</sup>

Un subgrup de 80 pacients d'aquesta cohort (70 amb FA i 10 controls sans) són els que s'inclouen en l'**article 6**.

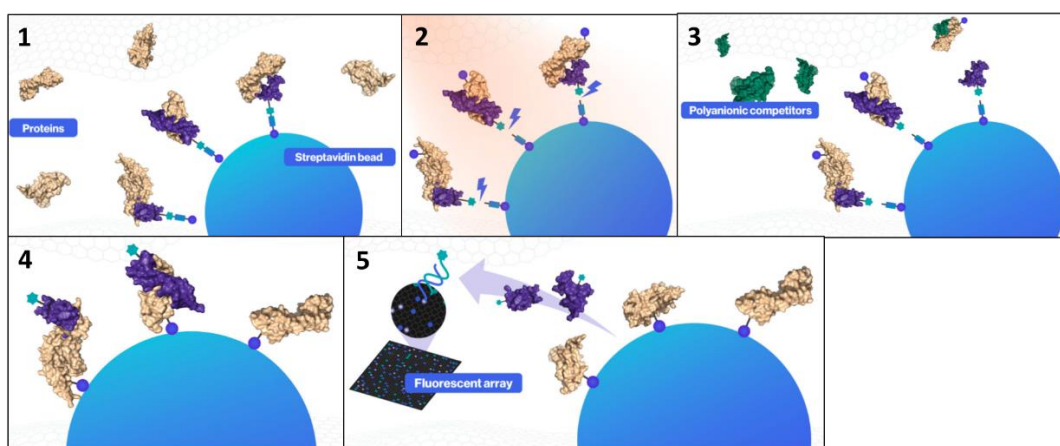
## 3.4. Mesura de biomarcadors

El processament de les mostres de sang en tots els estudis va ser el mateix. Es van utilitzar tubs de sèrum i EDTA per realitzar la extracció de sang. Tot seguit, es van centrifugar els tubs a 1500g i 4°C durant 15 minuts. A continuació es van realitzar alíquotes de sèrum i plasma que es van congelar a -80°C fins al moment de la utilització de les mostres.

En els estudis de descobriment de biomarcadors inclosos en aquesta tesi (article 2 i 4) s'ha utilitzat la tècnica SOMAscan® (SomaLogic Inc., Boulder, CO, USA), que s'explicarà en detall a continuació. En canvi, en les verificacions i validacions de biomarcadors candidats s'han utilitzat assaigs ELISA comercials o altres tècniques d'immunoassaig.

### 3.4.1. La tècnica SOMAscan

SOMAscan® (SomaLogic Inc., Boulder, CO, USA) és una plataforma proteòmica basada en la tecnologia dels aptàmers de DNA que en la versió utilitzada és capaç de mesurar 1305 proteïnes simultàniament.<sup>119</sup> En la Figura 8 s'il·lustren els passos que segueix aquesta tècnica.



**Figura 8:** Resum de la tècnica SOMAscan (adaptat de les instruccions proporcionades per SomaLogic).<sup>128</sup>

1) Els SOMAmers són aptàmers modificats (color lila) sintetitzats amb un fluoròfor, un enllaç fotoescendible, i una mol·lècula de biotina. Aquests s'uneixen a *beads* d'estreptavidina i s'utilitzen per capturar proteïnes dianes (color daurat) en una matriu complexa com pot ser el plasma. 2) Mentre les proteïnes que no s'han unit s'eliminen, les proteïnes unides s'etiqueten amb biotina. Tot seguit la llum ultraviolada trenca els enllaços fotoescendibles alliberant els complexos en la solució. 3) Les unions no específiques es dissocien i competidors polianiónics eviten que aquestes proteïnes es tornin a unir. 4) Les proteïnes biotilades juntament amb els SOMAmers units són capturades en un nou *bead* d'estreptavidina. 5) S'alliberen els SOMAmers dels complexos a través de la desnaturalització de les proteïnes. Els fluoròfors es mesuren després de la hibridació a seqüències complementàries en un microarray. La intensitat de fluorescència detectada en el microarray dependrà de la quantitat de proteïna disponible en la mostra original.

Després de les correccions aplicades per SomaLogic el resultat final s'expressa en unitats de fluorescència relativa.

### 3.5. Resum d'anàlisis estadístics

Per els anàlisis estadístics inclosos en aquesta tesi es va utilitzar el software R (versió 3.6.1 i 3.6.3, R Foundation for Statistical Computing), el SPSS (versió 20, IBM Corp), i el GraphPad Prism per a la elaboració de gràfics (versió 6; GraphPad Software).

Les particularitats dels anàlisis estadístics en cada estudi es descriuen en detall en la secció de mètodes de cada article.

De forma general, per a l'avaluació de la normalitat de les variables contínues es van utilitzar el test Kolmogrov-Smirnov o el test Shapiro-Wilk (mostres inferiors a 30). Els descriptius de les variables normals es van expressar com a mitjana $\pm$ desviació estàndard, i les no normals com a mediana (rang interquartílic). Per als anàlisis univariants de les variables contínues, es va utilitzar el test T d'estudent quan la variable era normal, i el Mann-Whitney en casos de distribució no normal. Si la variable d'interès tenia més de dues categories s'utilitzà l'ANOVA o el test de Kruskal-Wallis. Per comparar variables categòriques es va utilitzar el test  $\chi^2$ . Les correlacions entre variables contínues es van avaluar amb el coeficient de correlació de Pearson, o la Rho d'Spearman, depenent de la distribució de les variables.

En varis estudis hem construït models de regressió binària incloent biomarcadors candidats com a variables predictores juntament amb altres variables confusores. Per comparar models es va utilitzar el mètode De Long, que compara les àrees sota la corba (AUC, de l'anglès *area under the curve*) de les corbes ROC. Alternativament es va utilitzar l'índex IDI (de l'anglès *integrated discrimination improvement*). El IDI proporciona un valor numèric a la diferència existent entre les probabilitats predites per dos models. Aquesta diferència s'expressa de forma global i es podria dividir en si el nou model millora la probabilitat predita per els esdeveniments (sensibilitat) o per els no esdeveniments (especificitat).<sup>129</sup>

En l'article 4, per analitzar l'expressió diferencial es va utilitzar el paquet de Bioconductor *limma*, el qual utilitza models lineals amb modificacions de Bayes per a l'estimació de la variància.<sup>130</sup> Els resultats dels estudis de descobriment es van ajustar per comparacions múltiples amb el *False Discovery Rate* (FDR), el qual s'interpreta com que la probabilitat de la hipòtesis nul·la sigui certa després que el test estadístic l'hagi rebutjat, és a dir la probabilitat que el resultat sigui un fals positiu.<sup>131</sup> Per estudiar les magnituds de les diferències es va utilitzar el *fold-change* logarítmic

(logFC) que es calcula dividint l'expressió mitja dels valors d'un grup respecte els valors de l'altre en escala logarítmica. Finalment, els anàlisis d'enriquiment de vies es van realitzar seguint un protocol publicat utilitzant les eines GSEA (UC San Diego and Broad Institute) i Cytoscape (Cytoscape Consortium).<sup>132</sup>







## 4.RESULTATS



**N-Terminal Pro B-Type Natriuretic Peptide's Usefulness for Paroxysmal Atrial Fibrillation Detection Among Populations Carrying Cardiovascular Risk Factors**

(Palà E et al, Front Neurol. 2019 Nov 29;10:1226)

doi: 10.3389/fneur.2019.01226

---







**Blood-biomarkers and devices for atrial fibrillation screening: lessons learned from the AFRICAT (Atrial Fibrillation Research In CATalonia) study**

Under review

---





# Blood-biomarkers and devices for atrial fibrillation screening: lessons learned from the AFRICAT (Atrial Fibrillation Research In CATalonia) study

Elena Palà<sup>1</sup>, Alejandro Bustamante<sup>1,2,\*</sup>, Josep Lluís Clúa-Espuny<sup>3,4</sup>, Juan Acosta<sup>5</sup>, Felipe González-Loyola<sup>4,6</sup>, Sara Dos Santos<sup>7</sup>, Domingo Ribas-Seguí<sup>8</sup>, Juan Ballesta-Ors<sup>3,4</sup>, Anna Penalba<sup>1</sup>, Marina Giralt<sup>9</sup>, Iñigo Lechuga-Duran<sup>10</sup>, Delicia Gentile-Lorente<sup>10</sup>, Alonso Pedrote<sup>5</sup>, Miguel Ángel Muñoz<sup>4,6</sup>, Joan Montaner<sup>1,11,\*</sup>

- 1 Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR)-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- 2 Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain
- 3 Equip d'Atenció Primària Tortosa Est, SAP Terres de l'Ebre, Institut Català de la Salut, Tortosa, Spain
- 4 Institut d'Investigació en Atenció Primària IDIAP Jordi Gol, Unitat de Suport a la Recerca de Barcelona, Barcelona, Spain
- 5 Department of cardiology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain
- 6 Gerència Atenció Primària de Barcelona, Institut Català de la Salut, Barcelona, Spain
- 7 CAP Horta 7F, Àmbit d'Atenció Primària Barcelona ciutat, Institut Català de la Salut, Barcelona, Spain.
- 8 EAP Sant Pere i Sant Pau, Institut Català de la Salut, Tarragona, Spain
- 9 Biochemical department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- 10 Servicio Cardiología, Hospital Virgen De La Cinta, Institut Català Salut Tortosa, Tarragona, Spain
- 11 Institute de Biomedicine of Seville, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville & Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain.

**Corresponding author.** E-mail: abustamanter.germanstrias@gencat.cat.

**Background and objective:** AFRICAT is a prospective cohort study intending to develop an atrial fibrillation (AF) screening program through the combination of blood markers, rhythm detection devices, and long-term monitoring in our community. In particular, we aimed to validate the use of NT-proBNP, and identify new blood biomarkers associated with AF. Also, we aimed to compare AF detection using various wearables and long-term Holter monitoring. **Methods:** 359 subjects aged 65–75 years with hypertension and diabetes were included in two phases: Phase I (n=100) and Phase II (n=259). AF diagnosis was performed by baseline 12-lead ECG, 4 weeks of Holter monitoring (NuuboTM), and/or medical history. An aptamer array including 1310 proteins was measured in the blood of 26 patients. Candidates were selected according to p-value, logFC and biological function to be tested in verification and validation phases. Several screening devices were tested and compared: AliveCor, Watch BP, MyDiagnostick and Fibricheck. **Results:** AF was present in 34 subjects (9.47%). The aptamer array revealed 41 proteins with differential expression in AF individuals. TIMP-2 and ST-2 were the most promising candidates in the verification analysis, but none of them was further validated. NT-proBNP (log-transformed) (OR= 1.934; p<0.001) was the only independent biomarker to detect AF in the whole cohort. Compared to an ECG, WatchBP had the highest sensitivity (84.6%) and AUC (0.895 [0.780-1]), while MyDiagnostick showed the highest specificity (97.10%). **Conclusion:** The inclusion and monitoring of a cohort of primary care patients for AF detection, together with the testing of biomarkers and screening devices provided useful lessons about AF screening in our community. An AF screening strategy using rhythm detection devices and short monitoring periods among high-risk patients with high NT-proBNP levels could be feasible.

**Keywords:** atrial fibrillation; stroke; primary care; biomarkers

## 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is one of the most common cardiac arrhythmias in the general population and its incidence and prevalence are increasing globally, becoming an important public health problem [1]. Treatments exist to prevent the most important complications of AF as is the case of oral

anticoagulants (OACs) for stroke risk reduction [2]. However, this condition is frequently asymptomatic and paroxysmal, difficulting its diagnosis. As a consequence of the failure to detect AF at early stages, 10% of strokes are caused by previously unknown AF [3]. Screening strategies would potentially increase AF detection rates and reduce

its complications, but the best screening approach is not clear [4].

During recent years, a diversity of devices and new methodologies for AF detection have appeared, ranging from single time-point to long-term monitoring devices capable to identify brief asymptomatic AF episodes [5]. Although intensive monitoring periods increase the AF diagnostic yield [6], screening strategies in the primary care setting require inexpensive and cost-effective methodologies.

The incorporation of blood biomarkers into AF screening strategies is gaining interest. It represents an opportunity to enlarge the window for AF detection as some of them might present a kind of “biological memory” being elevated even outside AF episodes. A promising biomarker in this context is N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), which we recently found elevated in AF individuals, even in paroxysmal cases [7]. However, the usefulness of this biomarker needed to be confirmed and potentially complemented by others.

In the present work, we aimed to explore several tools to be applied in an AF screening program in the primary care health setting. In particular, we aimed to validate the use of NT-proBNP, and identify new blood biomarkers associated with AF. Also, we aimed to compare AF detection using various wearables and long-term Holter monitoring.

## 2. Methods

### 2.1. Study population

AFRICAT (Atrial Fibrillation Research in CATalonia; NCT03188484) is a prospective, multicenter, population-based screening study for AF. The study was divided into two phases: Phase I (2016-2017) for discovery and verification, and Phase II (2019-2020) for validation (Fig 1). Individuals aged 65-75 with a registered diagnosis of hypertension and diabetes were identified from the clinical records of three different Catalonia health areas (SAP Muntanya, SAP Reus, and SAP Terres de l’Ebre) and invited to participate in the study. Individuals with chronic inflammatory diseases, active cancer, or dementia were excluded. In Phase II, patients with a previous diagnosis of AF were also excluded. At a

baseline visit, patients received a comprehensive assessment consisting of clinical characteristics (demographic factors, vascular risk factors, medications, comorbidities, and vitals), and electrocardiography assessment. At the same baseline visit, several AF detection devices were tested (Watch BP, MyDiagnostick, and AliveCor or Fibrichck), and blood was collected. Moreover, patients received a wearable Holter device (Nuubo™) and were instructed by local trained researchers to wear it for 4 weeks as described previously [7]. AF diagnosis was performed by a baseline 12-lead electrocardiogram (ECG), 4 weeks monitoring with a wearable Holter device (Nuubo™), and/or medical history. On Holter monitoring, AF was defined as irregular R-R intervals without a P wave signal, lasting for more than 60s. Expert cardiologists blinded to clinical characteristics evaluated the anonymized Holter records and ECGs to identify AF episodes. Holter monitoring was optional in the patients with previous diagnosis of AF included in Phase I. More information about the study protocol has already been published [7].

The AFRICAT study protocol was approved by the clinical research ethics committees of IDIAP Jordi Gol (P15/047) and Hospital Universitari Vall d’Hebron [PR (AG) 133-2015]. All participants signed an informed consent before inclusion. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

### 2.2. Biomarker quantification

Blood was collected into EDTA and serum tubes at the time of inclusion. After centrifugation at 1500 g and 4°C for 15min, plasma and serum aliquots were frozen at -80°C until biomarker determination.

#### 2.2.1. Discovery study- Somascan

To identify proteins differentially expressed in AF individuals, an experimental design including discovery, verification, and validation phases was followed.

For the discovery study, protein levels in plasma were assessed using the SOMAScan® platform (SomaLogic Inc., Boulder, CO, USA), an aptamer-based proteomic assay measuring 1305 proteins

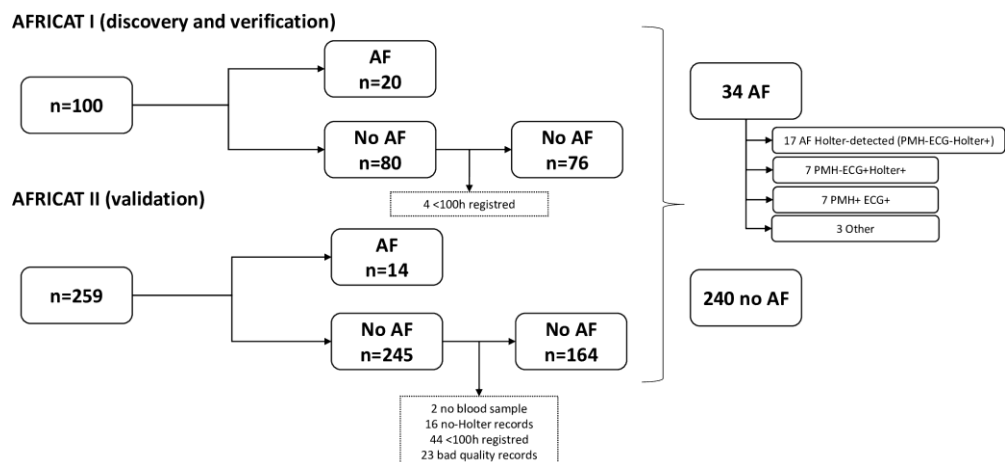


Figure 1. Flow chart of the AFRICAT study

simultaneously [8]. Normalization and calibration procedures were performed by SomaLogic according to their protocol and final data were reported in relative fluorescent units (RFU)[9]. The most promising candidates from this experiment (according to the best p-value, logFC and, plausible pathophysiological role) were verified in the whole Phase I subjects, and subsequently, the ones with nominal p-value <0.1 were selected to be validated in Phase II.

### 2.2.2. Verification and validation

For the verification and validation studies, selected proteins were quantified using commercial immunoassays: plasma  $\beta$ -endorphin and plasma interleukin-36 alpha (IL-36A) (MyBioSource, San Diego), plasma metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2), and serum interleukin-1 receptor antagonist protein (ILIRA) (R&D Systems, Minneapolis), plasma coagulation factor IX antigen (FIX) (Diagnostica Stago, Parsippany), plasma bone morphogenic protein 1 (BMP1), serum C-C motif chemokine 3-like 1 (CCL3L1), plasma dermatopontin (DPT) and serum polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)(Elabscience, Houston), and serum low-affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a (Fc $\gamma$ R-IIa)(Cloud-clone, Wuhan). Interleukin-1 receptor-like 1 (ST2/IL1RL1) was measured by ELISA assay in Phase I (R&D Systems, Minneapolis), and by the Ella technology (Proteinsimple) in Phase II. Several samples were tested in both technologies measuring ST-2 to establish their correlation and reproducibility. Plasma NT-proBNP levels were

determined by automated immunoassay in a COBAS c8000 (Roche Diagnostics).

All assays were performed blinded to clinical information and according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate and inter-assay variation was determined by a commercial control (Human Serum, male AB, USA origin from clotted, SIGMA, ref number H16914; Human plasma K2 EDTA, Innovative Research, ref number IPLA-N) tested in duplicate in each plate. Those samples with duplicated values showing a coefficient of variation (CV) higher than 20% were removed. When inter-assay variation was >20%, biomarker levels were standardized. In each separate phase, samples were randomized through the plates according to AF diagnosis to have the same % of cases in each plate. Therefore, standardization was performed, when needed, dividing all the sample's concentrations by a coefficient calculated as the plate-specific median between the overall plates median. The commercial control sample was used as a reference to standardize the results for the joined analysis of Phase I and Phase II.

### 2.3. Devices

At the baseline visit, AF detection devices were tested. At phase I AliveCor, Watch BP, and MyDiagnostick were used. Due to a high rate of unclassified cases (13.3%), AliveCor was replaced by Fibrichck in Phase II (Fig 2). AliveCor KardiaMobile (AliveCor, USA) [10] is a smartphone-based device that consists of an electrocardiographic recorder of



Figure 2. Devices used for AF detection

one derivation connected to a mobile phone application. MyDiagnostick (Applied Biomedical Systems, Netherlands) [11] is a single-lead ECG recorder with the shape of a stick with metallic handles (electrodes) at both ends. After a minute of holding the device with both hands, an indicator (green/red) of possible irregular pulse appears. It operates without additional hardware and can

record and store over 100 ECG's. Microlife WatchBP Home monitor (MicroLife, USA)[12] is an oscillometric digital blood pressure monitor device, which has an algorithm for AF detection based on the regularity of pulses. It automatically takes three sequential measurements to detect possible AF. Fibrichck (Fibrichck, Belgium) [13] is a mobile phone app based on photoplethysmography (PPG)

	Phase I AFRICAT n=100				Phase II AFRICAT n=259			
	All	AF (n=20)	No AF (n=80) <sup>a</sup>	No AF (n=76) <sup>b</sup>	All	AF (n=14)	No AF (n=245) <sup>a</sup>	No AF (n=164) <sup>b</sup>
Age	70 (68-73)	69 (66-71.75)	70 (68-73)*	70 (68-73)	72 (69-74)	71 (69-75)	72 (69-74)*	71 (69-73.75)
Sex (% female)	33 (33%)*	7 (35%)	26 (32.5%)*	24 (31.6%)*	153 (59.1%)*	7 (50%)	146 (59.6%)*	93 (56.7%)*
Alcohol	11 (11%)	1 (5%)	10 (12.5%)	10 (13.2%)	19 (7.4%)	0 (0%)	19 (7.8%)	12 (7.4%)
Tobacco	20 (20.2%)*	4 (20%)	16 (20.3%)*	15 (20%)*	23 (8.9%)*	0 (0%)	23 (9.4%)*	17 (10.4%)*
Dyslipidaemia	81 (81%)	16 (80%)	65 (81.3%)	61 (80.3%)	212 (81.9%)	10 (71.4%)	202 (82.4%)	133 (81.1%)
Coronary heart disease	18 (18%)	8 (40%)* <sup>s</sup>	10 (12.5%) <sup>s</sup>	10 (13.2%) <sup>s</sup>	49 (18.9%)	1 (7.1%)*	48 (19.6%)	33 (20%)
Heart failure	3 (3%)	3 (15%) <sup>s</sup>	0 (0%)* <sup>s</sup>	0 (0%)* <sup>s</sup>	23 (8.9%)	0 (0%)	23 (9.4%)*	13 (8%)*
Valvular disease	4 (4%)	3 (15%) <sup>s</sup>	1 (1.3%) <sup>s</sup>	1 (1.3%) <sup>s</sup>	12 (4.7%)	1 (7.1%)	11 (4.5%)	8 (4.9%)
Previous stroke	6 (6%)	2 (10%)	4 (5%)	2 (2.6%)	18 (6.9%)	0 (0%)	18 (7.3%)	14 (8.5%)
Anticoagulation	9 (9%)*	8 (40%)* <sup>s</sup>	1 (1.3%) <sup>s</sup>	1 (1.3%) <sup>s</sup>	2 (0.8%)*	0 (0%)*	2 (0.8%)	1 (0.6%)
Antiaggregation	50 (50%)	7 (35%)	43 (53.8%)	40 (52.6%)	130 (50.2%)	8 (57.1%)	122 (49.1%)	79 (48.2%)
SBP	143.5 (134-153.5)	140.5 (127.5-162.5)	144 (134-151.75)*	144 (134.25-151.75)*	139 (130.5-147.5)	143.5 (130.25-152.25)	138 (130-147)*	136.5 (130-147)*
DBP	78 (72.25-86)	79 (73.25-90.75)	78 (71.25-85.75)	78 (71.25-86)	76 (71-83)	74 (70.75-83.75)	76 (71-83)	76 (71.82)

Table 1: Clinical characteristics of the cohort and comparison according to atrial fibrillation diagnosis.

<sup>a</sup>Patients without AF included in the devices analysis. <sup>b</sup>Patients without AF included in the biomarker analysis excluding those without blood samples or short/bad quality registers. \*P-value < 0.05 Phase I vs Phase II comparison <sup>s</sup>P-value < 0.05 AF vs no AF comparison.

AF, atrial fibrillation; DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure

technology. It uses the flashlight and the camera of the mobile phone to measure the changes in blood flow and calculate the heart rate.

For each device, binary information about rhythm (rhythmic vs. arrhythmic) was recorded. Specificity, sensitivity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and area under the ROC curve (AUC) were calculated for each device in comparison to ECG results. For the analysis, unclassified device records were considered as No AF.

## 2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted with SPSS version 20 and R software version 3.6.3. Data were expressed as number (%) for categorical variables and as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range) for continuous variables, depending on its distribution. For univariate analysis, the Mann–Whitney U-test or Student's t-test was used for continuous variables, and the  $\chi^2$  test was used for categorical variables.

The number needed to screen was calculated dividing the number of patients included, by the number of new AF cases detected.

For the discovery experiment, p-values were corrected using false discovery rate (FDR), and base 2 logarithmic fold-changes (logFC) were calculated for each protein by subtracting abundance logarithmic values of the AF to the non-AF samples ( $\log_{2}FC = \log [AF \text{ mean}/no \text{ AF mean}]$ ). The Spearman test was used for correlations. Comparisons were first performed between AF patients vs no AF patients, and second between Holter-detected AF vs no AF patients (excluding AF patients diagnosed with other methodologies). Biomarker levels were log-transformed and forward stepwise logistic regression was used to select the ones that independently predicted AF in the whole cohort. Binary logistic regression analyses were performed including the most promising biomarkers and clinical variables of interest (sex, age, heart failure, ischemic cardiopathy, and valvular disease).

The sample size needed for Phase I was calculated aiming to detect a minimum of 10 cases of AF to perform a biomarker case-control discovery experiment and further verification. According to unpublished data from the AFABE study [14], the

prevalence of AF in patients with hypertension and diabetes in our community was 9.6%, therefore, a sample of 100 patients was included in phase I. Then, for Phase II sample size was estimated based on phase I biomarker results (power of 80%,  $\alpha=0.05$ ) (Ene 3.0, GlaxoSmithKline, UK). According to these calculations, the sample size for Phase II should be between 60, 213, or 282 depending on the biomarker data used for sample size calculation (NT-proBNP, ST-2, or TIMP-2, respectively).

## 3. Results

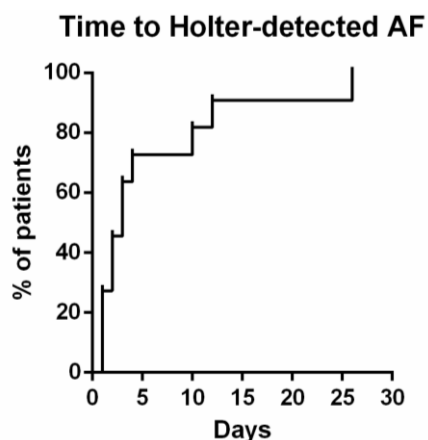
### 3.1. Patient Characteristics and AF Detection

100 patients were included in Phase I and 259 in Phase II (Fig 1). The number needed to screen to detect one new AF case in our study was 14.96. Clinical characteristics of the cohort can be found in Table 1.

In general, anticoagulation treatment was more frequent in the AF group ( $p<0.001$ ). Also, there were some clinical differences between the two phases. In the no AF group, older age ( $p=0.015$ ), female sex ( $p<0.0001$ ), heart failure ( $p=0.004$ ), and higher levels of systolic blood pressure ( $p=0.004$ ) were more common in Phase II in comparison to Phase I, while smoking ( $p=0.010$ ) was more common in Phase I. In the AF group, anticoagulant treatment ( $p=0.011$ ) and coronary heart disease ( $p=0.005$ ) were more common in Phase I. Median monitoring time was 506 hours (IQR 267h-600h). Holter monitoring was not evaluable in 16 patients, and 44 had short monitoring periods. Therefore, patients with poor Holter records ( $<100$  h registered and/or with artifacts) were excluded from the biomarker analysis to avoid misclassifications (Fig 1). All the patients had a baseline ECG done and therefore were included in the device's analysis.

AF was presented in a total of 34 subjects (24 newly detected within the present study). AF cases were classified according to how AF diagnosis was performed in 4 groups, defined by past medical history (PMH) for AF, ECG findings, and Holter AF detection as follows: PMH-ECG-Holter+ (Holter-detected AF), PMH-ECG+Holter+, PMH+ECG+, and others. According to this classification, 17 individuals were only diagnosed during the Holter monitoring period (Holter-detected AF), 7 in Phase I and 10 in Phase II. From these, 82.35% had AF

episodes during the first 7 days, and 88.23% during the first two weeks (Fig 3). 7 individuals, 4 in Phase I, and 3 in Phase II, had a new-onset AF on baseline ECG. In all those patients, AF was also found in the Holter register. 7 individuals in Phase I had previous medical history of AF, confirmed by ECG in the baseline visit, and during the Holter monitoring period in those who were followed-up (monitoring in this group was optional). Finally, as others, we classified those patients with an external diagnosis of AF, previous to the study or during the study, not detected by the ECG or the Holter in the present study.



**Figure 3.** Kaplan-Meier curve reflecting the AF detection time within the patients with Holter-detected AF.

### 3.2. Biomarker analysis

#### 3.2.1. Discovery

For the discovery study, a subset of 13 AF patients (from which, 7 Holter-detected AF), and 13 no AF patients with long monitoring registers (>450h) were selected from the whole Phase I.

In this subset, patients with AF tended to be younger ( $p=0.087$ ) and have higher rates of coronary heart disease ( $p=0.073$ ) than no AF patients. Besides, anticoagulation treatment was more common in the AF group ( $p=0.039$ ), and antiplatelet treatment was more common in the no AF group ( $p=0.006$ ). The other variables were similar between the two groups.

From the evaluated 1305 proteins, 41 proteins had differences between the two groups (nominal  $p$ -

value $<0.05$ ) (S1 Table): 19 had higher levels in patients with AF, and 22 in patients without AF. No protein remained significant after correction by multiple comparisons. 11 candidates were chosen because of the best  $p$ -value, logFC and, plausible pathophysiological role to be tested in the whole Phase I (Table 2). Other candidates, like NT-proBNP, were previously tested in this cohort [7].

#### 3.2.2. Verification

From the 11 proteins tested, TIMP-2 [ $116.33 \pm 23.11$  ng/ml vs  $106.36 \pm 23.67$  ng/ml,  $p=0.097$ ] and ST-2 [ $32695.13$  pg/ml (IQR 23739.93–44271.92) vs  $27488.75$  pg/ml (IQR 20538.90–34175.25),  $p=0.064$ ] tended to have higher levels in AF patients, and factor IX [ $118.50 \pm 28.01\%$  vs  $133.25 \pm 22.62$ ,  $p=0.015$ ] had lower levels in AF patients (Table 2). The remaining biomarkers were no different between the two groups. None of the biomarkers had significant differences when comparing Holter-detected AF vs no AF.

The known effect of anticoagulation in the factor IX levels [15,16] could not be eliminated from our data, as 40% of the AF patients were previously anticoagulated (mainly due to previous AF history) in comparison to only 1.3% of no AF patients. Therefore, patients on oral anticoagulants were removed from the analysis, and the difference was no longer significant ( $p=0.747$ ). For that reason, this protein was not selected to be tested in phase II.

Therefore, as shown the best results in this phase, TIMP-2 and ST-2 were selected to be tested in phase II, together with NT-proBNP, which had previously shown promising results, even to detect paroxysmal AF[7] (Fig 4 and S1 Fig).

**Fig 4.** Boxplot distribution of the 3 proteins selected for validation (NT-proBNP, ST-2 and TIMP-2) according to AF diagnosis

#### 3.3.3. Validation

An automated immunoassay (Ella technology, Proteinsample) was used to test ST-2 in the validation phase. First, 24 samples from the verification phase were also tested with Ella technology to establish the reproducibility between this technique and the one previously used (Quantikine, R&D Systems). Both techniques showed a strong correlation ( $r=0.893$ ,  $p<0.001$ ).

**Table 2: Results from the comparisons of biomarker levels between AF and no AF in each phase of the biomarker study**

Name	Uniprot	Discovery (n=26)			Phase I Verification (n=96)	Phase II Validation (n=178)
		p value	FDR	Fold change	P-value	P-value
<b>N-terminal pro-BNP*</b>	P16860	0.001	0.986	2.487	<0.001	0.102
<b>Dermatopontin (DPT)</b>	Q07507	0.008	0.986	-0.568	0.758	-
<b>Interleukin-1 receptor-like 1 (ST-2)</b>	Q01638	0.015	0.986	0.880	0.064 <sup>s</sup>	0.123
<b>Coagulation factor IX (FIX)</b>	P00740	0.015	0.986	-0.292	0.015	-
<b>Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2)</b>	P16035	0.019	0.986	0.245	0.097 <sup>s</sup>	0.823
<b>Beta-endorphin</b>	P01189	0.026	0.986	-0.419	0.628	-
<b>Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL1RA)</b>	P18510	0.026	0.986	-0.447	0.311	-
<b>C-C motif chemokine 3-like 1(CC3L1)</b>	P16619	0.027	0.986	0.253	0.262 <sup>s</sup>	-
<b>Interleukin-36 alpha (IL36-A)</b>	Q9UHA7	0.031	0.986	0.491	0.207 <sup>s</sup>	-
<b>Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)</b>	P01833	0.033	0.986	0.579	0.242 <sup>s</sup>	-
<b>Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a (FcγR-IIa)</b>	P12318	0.038	0.986	1.141	0.111 <sup>s</sup>	-
<b>Bone morphogenetic protein 1 (BMP1)</b>	P13497	0.039	0.986	-0.287	0.937	-

\*NT-proBNP was already tested in Phase I as part of another study [7]

TIMP-2 and NT-proBNP were measured with the same techniques as the previous phase.

From the 3 proteins tested, none of them showed significant differences in Phase II (Table 2). Yet, NT-proBNP and ST-2 tended to have increased levels in AF. None of them showed significantly higher concentrations in Holter-detected AF (Fig 4, S1 Fig).

NT-proBNP (log-transformed) (OR = 1.934; 95% CI, 1.525–2.454; p<0.001) was the only biomarker that entered a logistic regression analysis performed in the whole cohort to detect any AF. As a result, the discriminating ability (area under the ROC curve) of NT-proBNP in the whole cohort was 0.771 (95% CI, 0.686-0.856, p<0.0001). If we correct the logistic regression model by forcing the introduction of some clinical variables (sex, age, heart failure, ischemic cardiopathy, and valvular disease), NT-proBNP (OR = 2.101; 95% CI, 1.602–2.755; p<0.001) remained an independent predictor and the predictive ability of the model improved (AUC=0.807; 95% CI, 0.731-0.882).

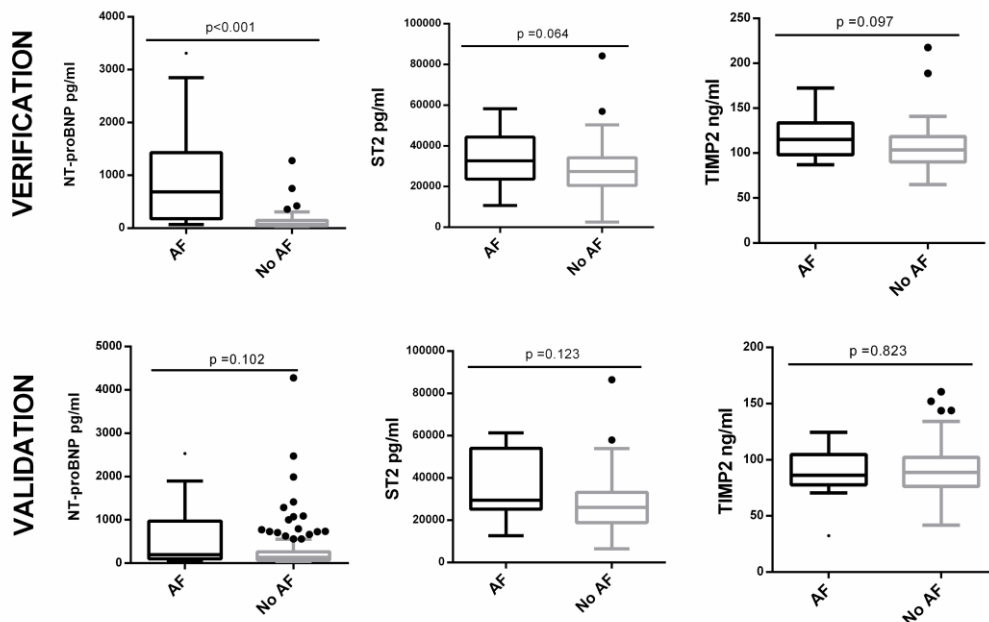
The previous suggested cut-off point of NT-proBNP>95pg/ml [7] showed 91.2% sensitivity, 44.2% specificity, 18.8% positive predictive value

(PPV), and 97.2% negative predictive value (NPV) to detect any AF and 82.4% sensitivity, 44.2% specificity, 9.5% PPV, and 97.2% NPV to detect paroxysmal AF. Alternatively, the cut-off point of NT-proBNP>125pg/ml showed 76.5% sensitivity, 53.8% specificity, 19% PPV, and 94.2% NPV to detect any AF and 52.9 % sensitivity, 53.8% specificity, 7.5% PPV, and 94.2% NPV to detect paroxysmal AF.

### 3.3. Devices

From the 359 included individuals, AF was observed in 14 cases in ECG. MyDiagnostick and WatchBP were used in all the patients. AliveCor was used in the 100 individuals included in Phase I (11 with positive ECG). 13.3% of the results were not interpretable by AliveCor and assigned to No AF. Consequently, this device was substituted by Fibrichck in Phase II, which was used in the 259 remaining individuals (3 with positive ECG). The Fibrichck readings resulted in a low signal in 5 cases (1.93% of results) and were also assigned to No AF.





**Figure 4.** Boxplot distribution of the 3 proteins selected for validation (NT-proBNP, ST-2 and TIMP-2) according to AF diagnosis

From the included 359 individuals, one patient was excluded from the comparisons because of the impossibility to use the devices due to left-hand amputation. Also, one patient referred pain during arterial pressure measurement due to an arteriovenous fistula that avoided Watch BP measurement. Table 3 shows the sensitivity,

specificity, PPV, PNV, and AUC for each device in comparison to the conventional ECG. Although some devices were only tested in a subset of patients, WatchBP was found as the device showing the best sensitivity (84.6%) and AUC (0.895 [0.780-1]) compared to ECG, while MyDiagnostick showed the best specificity (97.10%). Also, it should be

**Table 3:** Number of AF cases detected by each device and diagnostic performance measures in comparison to ECG.

	AF (All)	AF (ECG)	Sens.	Spec.	PPV	NPV	AUC (ECG ref.) (IC 95%)
<b>MyDiagnostick (n=358)</b>	13	10	76.9%	97.10%	50%	99.1%	0.870 (0.734-1.00)
<b>WatchBP (n=357)</b>	15	11	84.6%	94.5%	36.7%	99.4%	0.895 (0.780-1.00)
<b>AliveCor (n=99)</b>	10	8	80%	95.5%	66.7%	97.7%	0.878 (0.729-1.00)
<b>Fibricheck (n=259)</b>	6	1	33.3%	93.4%	5.6%	99.17%	0.633 (0.267-1.00)

NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value.

The first column indicates the number of AF from the total detected by each device (here we count AF cases detected by Holter monitoring). The second column indicates the number of AF from the ones detected by ECG, also detected by each device. Sensitivity, specificity, PPV, NPV and AUC were calculated using the ECG as a reference.

taken into account that some patients with positive results in the previous devices had AF detected during the monitoring period (Table 3).

#### 4. Discussion

In the present study, we aimed to explore several tools to detect AF with the final purpose to develop an AF screening strategy that could be applied in our community. Specifically, we aimed to identify blood biomarkers associated with AF, and compare AF detection using various screening devices and long-term monitoring. As key findings, we validated NT-proBNP to identify patients with AF, but failed to find new biomarkers that could improve its performance. Also, from all the devices tested, we found that WatchBP had the best sensitivity compared to ECG as gold-standard, while MyDiagnostick had the best specificity.

These results were obtained from a cohort of 359 high-risk patients, of which 34 patients had AF. Interestingly, 24 subjects were diagnosed for the first time during the study period and would potentially benefit from anticoagulant treatment to prevent future strokes. A future follow-up of this cohort of patients will provide more data in this regard. It should be taken into account that AF prevalence in phase I was much higher than in phase II, mainly due to the inclusion of already diagnosed AF patients. These patients were included in Phase I to increase the statistical power of the biomarker discovery study. However, to avoid potential selection bias and confounding effects during the biomarker validation, those patients were excluded from phase II.

The number needed to screen to detect one new AF case was less than 15 in our study, much lower than single-time-point screening studies [17]. This is not surprising as diagnostic yield increases with duration, number, and temporal dispersion of the screening [6]. Yet, large monitoring periods are not feasible in screening studies, at least not in every single patient. In our study, patients were mainly diagnosed during the first monitoring days and therefore, we can argue that shorter monitoring periods, for example during one week (capturing 80% of the cases) or during 2 weeks (capturing almost 90 % of the cases), would be a good option in this setting. In fact, in the screening context, it has been difficult to convince patients to wear a Holter device for many days. Although few adverse

events were reported during the use of the device, some patients complained regarding its discomfort, especially in the summer period, and this was one of the main reasons for denying participation in the study. In the study of Zöga et al [6], when targeting participants with risk factors (older, male, and with higher NT-proBNP) the diagnostic yield of all methodologies increased [6]. Therefore, prioritizing the identification of high-risk individuals to follow for short monitoring periods, even repeated over time, would probably increase patient's adherence and satisfaction, and decrease costs and workload, while identifying a high proportion of AF cases.

In our study we have already targeted a high-risk population, focusing on hypertensive and diabetic patients of advanced age, conditions that increase the AF prevalence [18]. However, the application of a clinical risk model in this group of patients will optimize even more the selection of candidates to screen. Results have been previously published on the possible relationship between the clinical profile and the risk of AF [19].

As stated before, we confirmed the usefulness of NT-proBNP to detect AF patients in our cohort, but its use was limited in identifying paroxysmal AF cases. Moreover, specificity and positive predictive values were low when aiming a sensitive cut-off (e.g 95 pg/ml or 125 pg/ml). NT-proBNP >125pg/ml was used as a selection tool in the STROKESTOP II study [20] showing higher sensitivity and similar specificity to diagnose AF. However, in their study, as the low-risk group was only screened with an ECG recording the biomarker sensitivity to detect paroxysmal AF could not be tested. Although NT-proBNP is a good candidate, new biomarkers that could complement and improve its predictive accuracy are needed. With this aim, we performed a comprehensive assessment of blood biomarkers by proteomic arrays. However, we should highlight the limitations and difficulties of "discovery" designs in a complex pathology as AF, in which the broad categories under which we classify and compare the patients are not clearly defined. First, we cannot discard the misclassification of subjects in the no AF group. Following the data of Zöga et al [6], 30 days of monitoring would only have identified 34% of patients and some of our records were even shorter. Second, the natural history of AF and the hypothesis that AF may be just a bystander of an underlying disease process called atrial

cardiomyopathy that confers stroke susceptibility should be taken into account [21,22]. Therefore, some individuals without AF may have an “AF substrate” with equal stroke risk and be biologically similar to the AF group. All together, these facts add background noise in discovery experiments, especially when performed in a small number of samples. These may be some of the reasons why we have obtained poor results in verifying the discovery study. Another reason may be the inclusion of permanent AF cases in that discovery. This may have revealed proteins increased in permanent AF but not in paroxysmal AF, which are the most interesting cases to identify with biomarkers due to the difficulty to be detected by other methodologies. From all the biomarkers of the discovery experiment, ST-2 and TIMP-2 were selected as the most promising biomarkers. ST2 is a receptor for interleukin-33 and its soluble form, which is released from the myocardium and vascular endothelial cells in response to pressure or volume overload, had been proposed as a promising biomarker for heart failure [23]. It had also been associated with AF, especially regarding its progression [24]. TIMP-2 is an inhibitor of matrix metalloproteinases and its circulating levels in AF patients in comparison to sinus rhythm are controversial [25,26]. Nevertheless, none of these biomarkers were validated in Phase II of the study, probably due to the higher amount of paroxysmal AF cases, which these biomarkers were not able to detect. From both biomarkers, ST-2 showed a trend to be elevated in AF patients and seemed an interesting biomarker but it did not improve the performance of NT-proBNP. Previous discovery experiments have described other biomarkers related to incident or prevalent AF but their use in screening protocols needs to be further assessed [27–29].

Regarding the AF detection devices, in our study, we tested the performance of four devices (MyDiagnostick, WatchBP, AliveCor, and Fibrichck) using different technologies: oscillometry, photoplethysmography, and handled-ECG. It should be noted that the comparison may have been affected by the fact that we exchanged one of the devices from Phase I to Phase II, and, therefore, the sample used for all the devices was not the same. Particularly, the difference in the number of AF cases detected in each phase may have influenced the device’s diagnostic performance

measures. For example, the use of Fibrichck uniquely during Phase II, with only 3 patients detected by baseline ECG, biased the calculation of its sensitivity. As a result, the no detection of one of these three patients gave a sensitivity of 33%, which is not accurate and makes difficult its comparison. Regarding the other devices, despite a relatively small sample size, our study showed similar sensitivity and specificity rates to previous studies when compared to ECG [5]. In fact, the meta-analysis performed by Taggar et al [30], stated that blood pressure monitors like WatchBP showed the highest values of sensitivity to detect AF while specificity was higher in non-12-lead-ECG like MyDiagnostick and AliveCor. Nevertheless, sensitivity rates observed seemed insufficient for routine use in clinical practice, at least for a single-time screening purpose. However, most of the tested devices were not intended for single-time use, but their best performance may be obtained after several sequential registers at different time points, even by the patient itself after symptoms presentation. According to our experience, WatchBP, with the highest sensitivity, is one of the most advantageous devices in a clinical setting for population screening strategies. Also, NICE (National Institute for Health and Care Excellence) advocates the use of WatchBP for the detection of AF in patients already being monitored for hypertension taking advantage of the dual functionality of the device [31]. On the other hand, the benefits of MyDiagnostick, AliveCor, and Fibrichck might be higher for patients’ self-monitoring. As ECG confirmation is mandatory by guidelines for the diagnosis of AF, handled ECG devices that provide a verifiable ECG trace, like MyDiagnostick and AliveCor, present a clear advantage [4].

Although the results obtained in the present project are not accurate enough to implement a screening program, the collaboration of a multidisciplinary team integrating primary care physicians, cardiologists, and researchers working together, provided useful lessons to take into account in primary care AF management and future study designs. Taking into account all our results the use of a clinical predictive model in combination with screening devices (e.g WatchBP or MyDiagnostick) and biomarkers (e.g. NT-proBNP) would probably be useful to select high-risk patients to be monitored for AF detection. Then, selected patients could be

monitored continuously during short periods with a wearable Holter device (e.g. 7 days). In our experience, primary care physicians could be in charge of the monitoring with the collaboration of cardiologists to interpret the records. Another option would be the patient self-monitoring using devices or mobile applications (e.g. Fibrichck, AliveCor, MyDiagnostick). The cost-effectiveness of a screening design like that needs to be further evaluated.

Apart from the limitations discussed until now, the main limitation of our study was the reduced sample size. Although the final sample size was inside the sample calculation window, we aimed to a larger sample size in Phase II, corresponding to the upper limit of sample size calculation (n=282). However, the initiation of the Covid-19 pandemic and the finalization of the financial period for the study limited the inclusion. More important, even though a large number of patients were included, the prospective nature of the study limited the number of AF detected. The limited number of AF patients may prevent generalizability of our results and should be further confirmed. The sample size limitation was particularly important in analyses performed in a subset of patients, like the discovery biomarker experiment. Also, due to some technical problems with the wearable Holter devices, some patients had to be excluded from some analyses, reducing, even more, the statistical power. Finally, the participant selection was not randomized and might have suffered selection bias (eg. healthy user bias, or patients with more cardiac pathologies being more prone to participate). However, this cohort represents a population that would participate in an AF screening study.

## 5. Conclusions

The inclusion and monitoring of a cohort of primary care patients for AF detection, together with the testing of biomarkers and screening devices provided useful lessons about AF screening in our community, despite the limited results obtained. An AF screening strategy using rhythm detection devices and short monitoring periods among high-risk patients with high NT-proBNP levels could be feasible.

Moreover, the present results will contribute to the AFFECT-EU initiative in which information from different European screening studies will permit

estimating and drawing conclusions on the efficacy of different screening methods and strategies [32].

## 6. References

1. Schnabel RB, Yin X, Larson MG, Magnani JW, Ellinor PT, Philip A. Fifty-Year Trends in Atrial Fibrillation Prevalence, Incidence, Risk Factors, and Mortality in the Community Renate. *Lancet*. 2015;386: 154–162. doi:10.1016/S0140-6736(14)61774-8.
2. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians. 2007;146:857-67. doi:10.7326/0003-4819-146-12-200706190-00007
3. Perera KS, Vanassche T, Bosch J, et al. Global Survey of the Frequency of Atrial Fibrillation-Associated Stroke: Embolic Stroke of Undetermined Source Global Registry. *Stroke*. 2016;47: 2197–2202. doi:10.1161/STROKEAHA.116.013378
4. Freedman B. Screening for Atrial Fibrillation A Report of the AF-SCREEN International Collaboration. 2017; 1851–1867. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026693
5. Zungsontiporn N, Link MS. Newer technologies for detection of atrial fibrillation. *BMJ*. 2018;363: 1–18. doi:10.1136/bmj.k3946
6. Diederichsen SZ, Haugan KJ, Kronborg C, et al. Comprehensive Evaluation of Rhythm Monitoring Strategies in Screening for Atrial Fibrillation: Insights from Patients at Risk Monitored Long Term with an Implantable Loop Recorder. *Circulation*. 2020;141: 1510–1522. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044407
7. Palà E, Bustamante A, Clúa-Espuny JL, et al. N-Terminal Pro B-Type Natriuretic Peptide's Usefulness for Paroxysmal Atrial Fibrillation Detection Among Populations Carrying Cardiovascular Risk Factors. *Front Neurol*. 2019;10: 1–9. doi:10.3389/fneur.2019.01226
8. Gold L, Ayers D, Bertino J, et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*. 2010;5:e15004. doi:10.1371/journal.pone.0015004

9. Candia J, Cheung F, Kotliarov Y, et al. Assessment of Variability in the SOMAscan Assay. *Sci Rep.* 2017;7: 1–13. doi:10.1038/s41598-017-14755-5
10. Lau JK, Lowres N, Neubeck L, et al. iPhone ECG application for community screening to detect silent atrial fibrillation: A novel technology to prevent stroke. *Int J Cardiol.* 2013;165: 193–194. doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.220
11. Tieleman RG, Plantinga Y, Rinkes D, et al. Validation and clinical use of a novel diagnostic device for screening of atrial fibrillation. *Europace.* 2014;16: 1291–1295. doi:10.1093/europace/euu057
12. Kearley K, Selwood M, Van Den Bruel A, et al. Triage tests for identifying atrial fibrillation in primary care: A diagnostic accuracy study comparing single-lead ECG and modified BP monitors. *BMJ Open.* 2014;4. doi:10.1136/bmjopen-2013-004565
13. Proesmans T, Mortelmans C, Van Haelst R, Verbrugge F, Vandervoort P, Vaes B. Mobile phone-based use of the photoplethysmography technique to detect atrial fibrillation in primary care: Diagnostic accuracy study of the fibrichk app. *JMIR mHealth uHealth.* 2019;7: 1–11. doi:10.2196/12284
14. Clua-Espuny JL, Lechuga-Duran I, Bosch-Princep R, et al. Prevalence of Undiagnosed Atrial Fibrillation and of That Not Being Treated With Anticoagulant Drugs: the AFABE Study. *Rev Española Cardiol (English Ed).* 2013;66: 545–552. doi:10.1016/j.rec.2013.03.003
15. Evans G, Wickham M, Bhavnani M. Factors II, VII, IX, and X concentrations in patients receiving long term treatment with warfarin. *J Clin Pathol.* 1987;40: 930. doi:10.1136/jcp.40.8.930-b
16. Favaloro EJ, Gilmore G, Bonar R, et al. Reducing the effect of DOAC interference in laboratory testing for factor VIII and factor IX: A comparative study using DOAC Stop andandexanet alfa to neutralize rivaroxaban effects. *Haemophilia.* 2020;26: 354–362. doi:10.1111/hae.13930
17. Lowres N, Neubeck L, Redfern J, Ben Freedman S. Screening to identify unknown atrial fibrillation: A systematic review. *Thromb Haemost.* 2013;110: 213–222. doi:10.1160/TH13-02-0165
18. Lau DH, Nattel S, Kalman JM, Sanders P. Modifiable Risk Factors and Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2017;136: 583–596. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023163
19. Abellana R, Gonzalez-Loyola F, Verdu-Rotellar JM, et al. Predictive model for atrial fibrillation in hypertensive-diabetic patients. *Eur J Clin Invest.* 2020;51:e13633. doi:10.1111/eci.13633
20. Gudmundsdottir KK, Fredriksson T, Svennberg, et al. Stepwise mass screening for atrial fibrillation using N-terminal B-type natriuretic peptide: the STROKESTOP II study. *Europace.* 2020;22: 24–32. doi:10.1093/europace/euz255
21. Goldberger JJ, Arora R, Green D, et al. Evaluating the Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation: Identifying the Arrhythmogenic and Thrombogenic Substrate. *Circulation.* 2015;132: 278–91.
22. Freedman B, Kamel H, van Gelder IC, Schnabel RB. Atrial fibrillation: Villain or bystander in vascular brain injury. *Eur Hear Journal, Suppl.* 2021;22: M51–M59. doi:10.1093/EURHEARTJ/SUAA166
23. Villacorta H, Maisel AS. Soluble ST2 Testing: A promising Biomarker in the Management of Heart Failure. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106: 145–152. doi:10.5935/abc.20150151
24. Ma X, Yuan H, Luan HX, Shi YL, Zeng XL, Wang Y. Elevated soluble ST2 concentration may involve in the progression of atrial fibrillation. *Clin Chim Acta.* 2018;480: 138–142. doi:10.1016/j.cca.2018.02.005
25. Wakula P, Neumann B, Kienemund J, et al. CHA2DS2-VASc score and blood biomarkers to identify patients with atrial high-rate episodes and paroxysmal atrial fibrillation. *Europace.* 2017;19: 544–551. doi:10.1093/europace/euw101
26. Liu Y, Xu B, Wu N, et al. Association of MMPs and TIMPs With the Occurrence of Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Can J Cardiol.* 2016;32: 803–813. doi:10.1016/j.cjca.2015.08.001
27. Molvin J, Jujic A, Melander O, et al. Exploration of pathophysiological pathways for incident atrial fibrillation using a multiplex proteomic chip. *Open Hear.* 2020;7: 1–8. doi:10.1136/openhrt-2019-001190

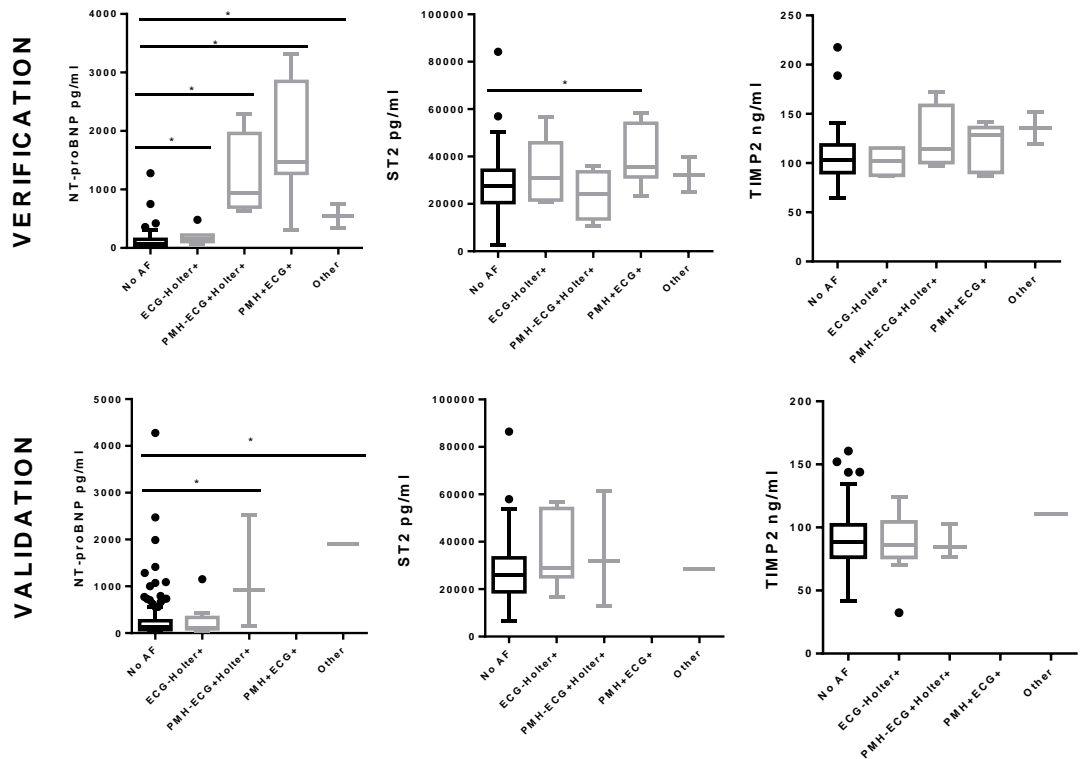
28. Ko D, Benson MD, Ngo D, et al. Proteomics Profiling and Risk of New-Onset Atrial Fibrillation: Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc.* 2019;8. doi:10.1161/JAHA.118.010976
29. Chua W, Purmah Y, Cardoso VR, Gkoutos G V., Tull SP, Neculau G, et al. Data-driven discovery and validation of circulating blood-based biomarkers associated with prevalent atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 2019;40: 1268–1276. doi:10.1093/eurheartj/ehy815
30. Taggar JS, Coleman T, Lewis S, Heneghan C, Jones M. Accuracy of methods for detecting an irregular pulse and suspected atrial fibrillation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23: 1330–1338. doi:10.1177/2047487315611347
31. Willits I, Keltie K, Craig J, Sims A. WatchBP Home A for opportunistically detecting atrial fibrillation during diagnosis and monitoring of hypertension: A NICE medical technology guidance. *Appl Health Econ Health Policy.* 2014;12: 255–265. doi:10.1007/s40258-014-0096-7
32. Engler D, Heidbuchel H, Schnabel RB. Digital, risk-based screening for atrial fibrillation in the European community—the AFFECT-EU project funded by the European Union. *Eur Heart J.* 2021; 1–3. doi:10.1093/eurheartj/ehab050



# Blood-biomarkers and devices for atrial fibrillation screening: lessons learned from the AFRICAT (Atrial Fibrillation Research In CATalonia) study

Elena Palà, Alejandro Bustamante, Josep Lluís Clúa-Espuny, Juan Acosta, Felipe González-Loyola, Sara Dos Santos, Domingo Ribas-Seguí, Juan Ballesta-Ors, Anna Penalba, Marina Giralt, Iñigo Lechuga-Duran, Delicia Gentile-Lorente, Alonso Pedrote, Miguel Ángel Muñoz, Joan Montaner

## SUPPLEMENTAL INFORMATION



Supplemental Figure 1: Boxplot distribution of the 3 proteins selected for validation (NT-proBNP, ST-2 and TIMP-2) according to the methodology used for AF diagnosis.



**Supplemental Table 1: Top table of the differential expressed proteins between AF and no AF. Results from the discovery study.**

Protein name	Uniprot	P.value	FDR	Fold change
<b>N-terminal pro-BNP</b>	P16860	0,001	0,986	2,487
<b>Dermatopontin (DPT)</b>	Q07507	0,008	0,986	-0,569
cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D	Q08499	0,010	0,986	0,302
Coagulation factor IXab	P00740	0,010	0,986	-0,306
<b>Interleukin-1 receptor-like 1 (ST-2)</b>	Q01638	0,015	0,986	0,881
<b>Coagulation factor IX (FIX)</b>	P00740	0,015	0,986	-0,292
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1, soluble	Q07954	0,015	0,986	0,287
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	Q07011	0,016	0,986	-0,162
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	P36507	0,016	0,986	-0,386
Troponin I, cardiac muscle	P19429	0,017	0,986	0,428
<b>Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2)</b>	P16035	0,019	0,986	0,244
Thrombin	P00734	0,020	0,986	-0,273
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	Q99714	0,020	0,986	0,358
Chymase	P23946	0,022	0,986	0,187
Brain natriuretic peptide 32	P16860	0,022	0,986	0,293
Collagen alpha-1(XXIII) chain	Q86Y22	0,022	0,986	0,179
Vitamin K-dependent protein C	P04070	0,023	0,986	-0,384
<b>Beta-endorphin</b>	P01189	0,026	0,986	-0,419
Laminin	P25391, P07942, P11047	0,026	0,986	0,313
Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 3	Q86VH5	0,026	0,986	-0,100
Adenylosuccinate lyase	P30566	0,026	0,986	0,013
<b>Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL1RA)</b>	P18510	0,026	0,986	-0,447
<b>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13 (ADAMTS13)</b>	Q76LX8	0,026	0,986	-0,333
<b>C-C motif chemokine 3-like 1 (CCL3L1)</b>	P16619	0,027	0,986	0,253
Transcription factor AP-1	P05412	0,028	0,986	0,184
Casein kinase II 2-alpha':2-beta heterotetramer	P19784 P67870	0,029	0,986	-0,252
<b>Interleukin-36 alpha (IL-36A)</b>	Q9UHA7	0,031	0,986	0,491
C5a anaphylatoxin	P01031	0,033	0,986	-0,415
<b>Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)</b>	P01833	0,033	0,986	0,579
Coagulation factor Xa	P00742	0,034	0,986	-0,409
Lipopolysaccharide-binding protein	P18428	0,036	0,986	0,165
Histone H2A type 3	Q7L7L0	0,038	0,986	0,518
Growth hormone receptor	P10912	0,038	0,986	-0,503
NKG2D ligand 2	Q9BZM5	0,038	0,986	-0,727
<b>Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a (FcγR-IIa)</b>	P12318	0,038	0,986	1,141
Fatty acid-binding protein, heart	P05413	0,038	0,986	-0,339
<b>Bone morphogenetic protein 1 (BMP1)</b>	P13497	0,039	0,986	-0,287
WAP, kazal, immunoglobulin, kunitz and NTR domain-containing protein 1	Q96NZ8	0,043	0,986	-0,375
Fibronectin Fragment 3	P02751	0,043	0,986	-0,340
Mitogen-activated protein kinase 11	Q15759	0,043	0,986	-1,091
Pro-opiomelanocortin	P01189	0,048	0,986	-0,740

Proteins selected to be verified in the whole Phase 1 are highlighted in grey. Proteins in bold but not highlighted were already tested in the whole phase 1 as part of a previous published work (Palà et al, 2019).





**B-type natriuretic peptide over N-terminal pro-brain natriuretic peptide to predict incident atrial fibrillation after cryptogenic stroke**

(Palà E et al, Eur J Neurol. 2021 Feb;28(2):540-547)

doi: 10.1111/ene.14579

---







**Proteins and pathways in atrial fibrillation and atrial cardiomyopathy underlying  
cryptogenic stroke**

(Accepted International Journal of Cardiology Heart & Vasculature)

---





# Proteins and pathways in atrial fibrillation and atrial cardiomyopathy underlying cryptogenic stroke

Elena Palà<sup>1</sup>, Jorge Pagola<sup>2</sup>, Jesus Juega<sup>2</sup>, Jaume Francisco-Pascual<sup>3,4</sup>, Anna Penalba<sup>1</sup>, Maite Rodriguez<sup>2</sup>, Mercedes De Lera Alfonso<sup>5</sup>, Juan F. Arenillas<sup>5</sup>, Juan Antonio Cabezas<sup>6</sup>, Francisco Moniche<sup>6</sup>, Reyes de Torres<sup>7</sup>, Soledad Perez-Sanchez<sup>7</sup>, Teresa González-Alujas<sup>4,8</sup>, Carlos A. Molina<sup>2</sup>, Alejandro Bustamante<sup>1</sup>, Joan Montaner<sup>9,\*</sup>

1. Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.
2. Stroke Unit, Vall d'Hebrón Hospital and Autonomous University of Barcelona, Medicine Department, Barcelona, Spain.
3. Arrhythmia Unit-Cardiology Department, Vall d'Hebrón Hospital, Barcelona, Spain.
4. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, CIBERCV.
5. Stroke Unit, University Hospital of Valladolid, Valladolid Spain.
6. Stroke Unit, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain.
7. Stroke Unit, University Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain.
8. Echocardiography Lab Cardiology Department, Vall d'Hebrón Hospital, Barcelona, Spain.
9. Institute de Biomedicine of Seville, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville & Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville.

\* Corresponding author: Joan Montaner (joan.montaner@vhir.org)

Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain

---

**Background:** Atrial fibrillation (AF) is one of the most prevalent causes of cryptogenic stroke. Also, apart from AF itself, structural and remodelling changes in the atria might be an underlying cause of cryptogenic stroke. We aimed to discover circulating proteins and reveal pathways altered in AF and atrial cardiomyopathy, measured by left atrial volume index (LAVI) and peak atrial longitudinal strain (PALS), in patients with cryptogenic stroke. **Methods:** An aptamer array (including 1310 proteins) was measured in the blood of 20 cryptogenic stroke patients monitored during 28 days with a Holter device as a case-control study of the Crypto-AF cohort. Protein levels were compared between patients with (n=10) and without AF (n=10) after stroke, and the best candidates were tested in 111 patients from the same cohort (44 patients with AF and 67 without AF). In addition, in the first 20 patients, proteins were explored according to PALS and LAVI values. **Results:** Forty-six proteins were differentially expressed in AF cases. Of those, four proteins were tested in a larger sample size. Only DPP7, presenting lower levels in AF patients, was further validated. Fifty-seven proteins correlated with LAVI, and 270 correlated with PALS. NT-proBNP was common in all the discovery analyses performed. Interestingly, many proteins and pathways were altered in patients with low PALS. **Conclusions:** Multiple proteins and pathways related to AF and atrial cardiomyopathy have been revealed. The role of DPP7 as a biomarker for stroke aetiology should be further explored. Moreover, the present study may be considered hypothesis-generating.

---

## 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is a prevalent cardiac rhythm disorder underlying up to one-third of all ischemic strokes [1]. Paroxysmal AF remains undetected in a high proportion of patients after stroke and is one of the most prevalent causes of cryptogenic stroke [2].

Also, there is increasing recognition that atrial dysfunction itself is associated with an increased risk of thromboembolism, even in patients without

AF [3]. Therefore, atrial substrate or atrial cardiomyopathy has been proposed as an important cause of cryptogenic strokes [4,5].

Left atria (LA) enlargement and atrial fibrosis are two structural hallmarks of the atrial substrate [3]. LA size has been associated with cardioembolic stroke and AF detection in patients with embolic stroke of undetermined source (ESUS) [6]. Similarly, peak atrial longitudinal strain (PALS), which measures the LA wall deformability and is a

surrogate of LA fibrosis, has been associated with AF in cryptogenic stroke patients [7].

Some blood biomarkers (e.g. natriuretic peptides) have been proposed as useful tools to detect paroxysmal AF [8]. In addition, circulating markers might allow noninvasive assessment of atrial cardiomyopathy before AF appears and might guide the selection of patients for more intensive post-stroke monitoring to personalize the secondary prevention treatments [2,5].

The present study aims to discover circulating proteins and reveal pathways altered in AF and atrial cardiomyopathy, measured by left atrial volume index (LAVI) and PALS, in patients with cryptogenic stroke.

## 2. Methods

### 2.1 Study population:

The study population represented a subpopulation of the Crypto-AF study [9,10]. Non-lacunar acute ischemic stroke patients over 55 years of age with cryptogenic stroke after standard evaluation were included in the study by four Spanish public Stroke Centers from January 2015 to July 2017. All patients included had no prior history of AF. Patients were monitored for 28 days with a wearable Holter device (Nuubo™) following a published protocol [9]. The software algorithm classified every episode of irregular ECG rhythm lasting >120s as possible AF. An expert cardiologist blinded to clinical data verified the episodes. From this cohort, a total of ten consecutive patients with AF detected during the monitoring period, and ten matched controls (by sex and age) without AF were selected for the present discovery study. In addition, 111 patients with available blood samples were used for the validation study (44 patients with AF and 67 matched controls).

Blood samples were collected into EDTA and serum separator tubes within 72 h after symptoms onset. After centrifugation at 1500 g and 4°C for 15 min, plasma and serum aliquots were frozen at -80°C until further analysis.

Left atrial size was measured by biplane transthoracic echocardiography to obtain the left atrial volume adjusted to body surface index (LAVI, ml/m<sup>2</sup>) following the latest guidelines [11]. Peak atrial longitudinal strain (PALS) was evaluated by

speckle tracking software (GE EchoPAC®) following expert recommendations [12].

Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved (PR (AG)49/2014) by the Ethical Committee of Vall d'Hebrón Hospital, Valladolid Hospital, Virgen Macarena Hospital and Virgen del Rocio Hospital, in line with Helsinki guidelines.

### 2.2 Aptamer array

Protein levels in plasma were assessed using the SOMAscan® platform (SomaLogic Inc., Boulder, CO, USA), which is an aptamer-based proteomic assay that allowed the simultaneous measurement and quantification of 1310 proteins [13]. This approach uses SOMAmers® reagents, which are short single-stranded DNA sequences with protein affinity. The platform transforms the proteins present in the biological sample into a corresponding SOMAmer signal, which then is quantified using the microarrays technology. Three different dilutions (depending on each protein abundance) were used. Normalization and calibration procedures were performed by SomaLogic according to their protocol [14]. All samples passed SomaLogic quality controls. A set of control calibrator samples were used to detect and remove systematic variability between independent assay runs. Seventy-nine proteins were marked as “flags” due to high inter-plate variability and eliminated from the analysis. Data were reported in relative fluorescent units (RFU) after normalization and calibration.

### 2.3 ELISA

Serum coiled-coil domain-containing protein 80 (CCDC80)(BosterBio), and plasma dipeptidyl peptidase 7 (DPP-7)(R&D Systems), bone morphogenetic protein 1 (BMP-1)(Elabscience), and cystatin-D (BosterBio) were determined by ELISA. All assays were performed blinded to clinical information and according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate, and inter-assay variation was determined by a commercial control (Human Serum, male AB, USA origin from clotted, SIGMA, ref number H16914; Human plasma K2 EDTA, Innovative Research, ref number IPLA-N) tested in duplicate in each plate. When inter-assay variation was >20%, biomarker levels were standardized by the common control sample. Samples with a CV (coefficient of

variation)>20% between duplicates were eliminated from the analysis.

## 2.4 Statistics

R software version 3.6.1 and SPSS version 20 were used to conduct statistical analysis. Categorical variables were expressed as numbers and percentages and continuous variables as mean  $\pm$  SD, or median (interquartile range) for continuous variables, depending on their distribution. Student's t-test, Mann–Whitney or  $\chi^2$  were used to compare variables between AF cases and controls depending on the type and distribution of each variable.

SOMAscan data were log-transformed as presented a skewed distribution. Differential expression analyses were performed using the “limma” package (Bioconductor) version 3.42.2, optimized for omics studies with large amounts of data and few samples [15].

Spearman correlations were calculated between LAVI or PALS and all the analyzed proteins. The R package “VennDiagram” version 1.6.20 was used to visualize the common proteins between the different analyses. All p-values were adjusted using Benjamini and Hochberg (BH) false discovery rate (FDR). Group matching by sex and age was used to select control samples in the discovery experiment. The validation sample size was estimated based on Somascan results (power of 80%,  $\alpha=0.05$ ) (Ene 3.0, GlaxoSmithKline, UK).

The addition of DPP7 to a logistic regression model fitted by age, sex, echocardiographic markers (LAVI and PALS), and NT-proBNP was tested using the Likelihood Ratio Test. Odds ratios (OR) for an increment of one unit of concentration were shown. The classification performance of the models was compared using Receiver Operating Curves. The R package “ggeffects” version 1.1.1 was used to plot the average predicted probability of the model when varying the variable of interest.

## 2.5 Pathway analysis

Pathway enrichment analysis was conducted following a published protocol[16]. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software was applied to all the SOMAscan proteins ordered by T-statistic or correlation coefficient against Reactome Pathways and Gene Ontology (biological processes)

databases. Gene sets with <15 genes or >200 genes were excluded. GSEA calculates a normalized enrichment score (NES) for each gene set. Positive and negative NES values represent enrichment of the corresponding gene set at the top (i.e., upregulated) or bottom (i.e., downregulated) of the ranked list. P-values were computed by gene set permutation for 1000. Then, multiple testing using a false-discovery rate (FDR) was applied to obtain the Q-values. Results were visualized via Cytoscape Enrichment Map with a Jaccard Overlap Combined Coefficient >0.375. Significant pathways were considered at Q-value<0.25.

## 3. Results

The descriptive characteristics of the 20 patients included in the discovery study are provided in Table 1. The median age was 71.5, and 55% were women. Clinical variables were similar between the two groups.

### 3.1 Differential protein expression and altered pathways in AF

Among the tested proteins, 46 were differentially expressed in AF cases at a nominal p-value of 0.05 (22 down-regulated and 24 up-regulated). Although no protein remained significant after multiple comparison correction, NT-proBNP showed the strongest association (p-value=0.001, logFC=1.86) and BNP was ranked sixth (p-value=0.008, logFC=0.39). Both natriuretic peptides were well-known biomarkers of AF, already validated in this cohort in a published study [8]. Proteins with p-values between NT-proBNP and BNP were selected to evaluate their usefulness in a larger group of patients: CCDC80 (p-value=0.0013), DPP-7 (p-value=0.0039), BMP-1 (p-value=0.0051), and Cystatin-D (p-value=0.0080) (Figure 1 and Supplemental Table 1).

GSEA analysis revealed five gene sets upregulated in patients with AF (Regulation of cellular response to growth factor stimulus, Lymphocyte chemotaxis, Calcium ion transmembrane transport, Lymphocyte migration, Chemokine receptors bind chemokines), and five gene sets downregulated (Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors, Interleukin-12 family signalling, Vesicle-mediated transport, Transport of small molecules and Interleukin-12 signalling). Most altered pathways

**Table 1. Clinical characteristics of the patients included in the discovery experiment and comparison according to atrial fibrillation detection.**

	All (n=20)	AF (n=10)	No AF (n=10)	p-value
Sex (%female)	11 (55%)	6 (60%)	5 (50%)	0.65 <sup>a</sup>
Age (years)	71.5 (67-80)	73.5 (69.75-80)	67.5 (62.25-81.5)	0.247 <sup>s</sup>
Hypertension	14 (70%)	7 (70%)	7 (70%)	1.00 <sup>a</sup>
Diabetes	5 (25%)	3 (30%)	2 (20%)	1.00 <sup>a</sup>
Vasculopathy	1 (5%)	0 (0%)	1 (10%)	1.00 <sup>a</sup>
Renal failure	1 (5.3%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0.47 <sup>a</sup>
COPD	1 (5.3%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0.47 <sup>a</sup>
Obesity	8 (40%)	5 (50%)	3 (30%)	0.65 <sup>a</sup>
Heart disease	2 (10%)	2 (20%)	0 (0%)	0.47 <sup>a</sup>
Basal NIHSS	4 (2-7)	3 (1-7)	5 (3-7)	0.29 <sup>s</sup>
LVEF (%)	64.74 ± 34.19	63 ± 7.84	66.30 ± 7.51	0.362 <sup>#</sup>
PALS (%)	25.76 ± 12.98	29.89 ± 14.06	20.59 ± 10.00	0.134 <sup>#</sup>
LAVI (ml/m <sup>2</sup> )	31 (27-37)	30 (27-34)	34 (22.5-37.75)	0.815 <sup>s</sup>
Number of AF episodes		28 (7-42.5)		
Longest AF episode (min)		780.48 (121.25-1510.71)		

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; LVEF, left ventricular ejection fraction; PALS, peak atrial longitudinal strain; LAVI, left atrial volume index.

The “heart disease” terminology included any cardiopathy that the investigator considered of interest, including into this category ischemic cardiopathy, and hypertensive cardiopathy, between others. The two patients with heart disease in this cohort had a mild mitral and aortic valvulopathy, and a hypertensive cardiomyopathy respectively.<sup>a</sup>Student’s t-test <sup>s</sup>Mann–Whitney test <sup>#</sup> $\chi^2$  test

were related to immune response and intracellular transport (Supplemental Figure 1).

### 3.1.2 Biomarker validation

The clinical characteristics of the 111 patients included in the validation study were provided in Supplemental Table 2. This subgroup was older ( $p=0.021$ ) and had a lower percentage of obesity ( $p=0.041$ ) in comparison to the discovery cohort. Several samples had a CV>20% between duplicates and were eliminated from the analysis accordingly. Therefore, we had a final sample size of 107 patients for CCDC80, 86 for DPP7, 95 for BMP1, and 97 for Cystatin-D. Levels from the four biomarkers were available from 74 patients. Analysis was performed with the patients available for each biomarker. DPP7 was significantly lower in individuals with AF compared with no AF [5.13 ng/ml (IQR 3.42-7.10) vs 6.16 ng/ml (5.04-8.39),  $p=0.013$ ], while the remaining biomarkers were not different between the two groups (Figure 2 and Supplemental Table 3). Sensitivity analyses were performed only, including the patients with values from all the biomarkers, obtaining similar results.

DPP7 alone was a predictor of AF (OR=0.828 per ng/ml [0.695–0.986],  $p=0.034$ ). Then, when adding DPP7 to a logistic regression model fitted with age,

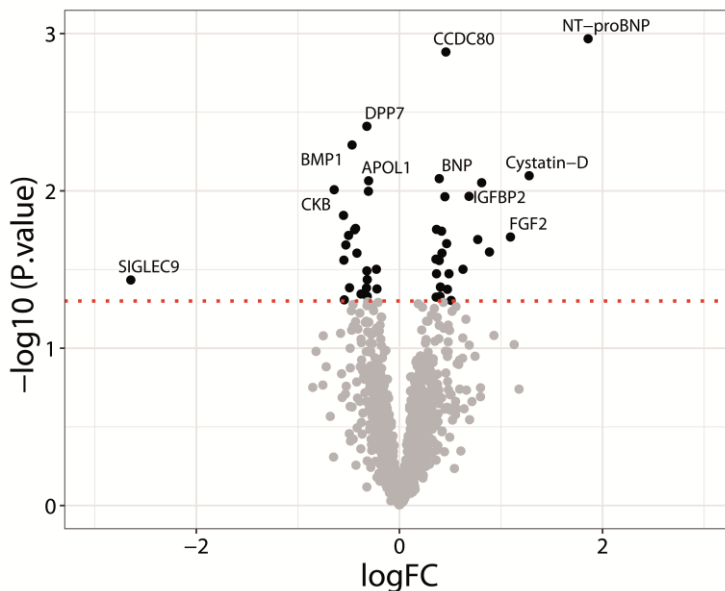
sex, PALS, LAVI, and NT-proBNP, it remained an independent predictor (OR=0.729 per ng/ml [0.539-0.988],  $p=0.041$ ). This model, including DPP7, showed better fit according to the likelihood ratio test ( $\chi^2= 6.001$ ,  $p=0.014$ ), and the AUC increased, although the DeLong test was not significant (0.657 [0.484-0.831] vs 0.756 [0.608-0.904],  $p=0.155$ ). The models were built with 51 complete cases with all the variables available (17 AF and 34 no AF) (Supplemental Figure 2).

## 3.2 Differential protein expression and altered pathways in atrial myopathy

### 3.2.1 LAVI

Fifty-seven proteins correlated significantly with LAVI (40 negative correlations and 17 positive correlations). From these, only 17 had a correlation coefficient  $r>|0.6|$ . No proteins remained significant after multiple corrections in any of the analyses (Supplemental Table 4 and Supplemental Figure 3).

The pathway analysis, considering the protein list ordered by the correlation coefficient between protein levels and LAVI, revealed only one gene set upregulated with LAVI with a Q-value<0.25: Netrin-1 signalling (R-HSA-373752).



**Figure 1. Volcano plot of differentially expressed proteins between AF cases and no AF.**

Black dots above the red line indicate significant proteins, while grey dots below the red line indicate non-significant proteins according to nominal p-value < 0.05. Labeled proteins are those with a nominal p-value < 0.01 or nominal p-value < 0.05 and  $|\logFC| > 1$ . Proteins with positive logFC had higher levels in the AF group and vice-versa.

### 3.2.2 PALS

Two-hundred-seventy proteins correlated significantly with PALS (117 negative correlations and 153 positive correlations). From these, only 64 had a correlation coefficient  $r > |0.6|$ , and six remained significant after multiple comparison corrections (Supplemental Table 5 and Supplemental Figure 4).

When proteins were ordered by the correlation coefficient between protein levels and PALS, 264 gene sets were enriched in patients with high PALS, and two were enriched in patients with low PALS (R-HSA-1630316, Glycosaminoglycan metabolism, and R-HSA-3781865, Diseases of Glycosylation). Dysregulated pathways were mostly involved in signal transduction, metabolism, immune response, and hemostasis. (Supplemental Table 6 and Supplemental Figure 5).

### 3.3 Common protein expression in AF and atrial myopathy

NT-proBNP was the only protein common in all the analyses performed. Five proteins were related to LAVI and PALS (Leukotriene A-4 hydrolase, Alpha-2-

macroglobulin, Histone H2A type 3, Secretin, and Fibroblast growth factor 12). One protein was associated with AF and LAVI (Cell adhesion molecule 3). Fourteen proteins were associated with AF and PALS (Urokinase plasminogen activator surface receptor, Lumican, Dermatopontin, Follistatin-related protein 3, C-C motif chemokine 25, Plasminogen, Coagulation factor VII, Natural killer cell receptor 2B4, Angiopoietin-2, Interleukin-23 receptor, Brain natriuretic peptide 32, Erythropoietin, Advanced glycosylation end product-specific receptor, and Macrophage mannose receptor 1)(Figure 3).

## 4. Discussion

In the present study, a wide variety of proteins have been explored in a cohort of cryptogenic stroke patients monitored for 1 month to detect AF.

Although several studies had previously explored individual biomarkers of cardioembolic stroke and/or AF in stroke patients [17], few studies had used a discovery approach to identify new candidates related to occult AF. In fact, the majority of AF “discovery” studies enrolled asymptomatic patients [18–20] and, to our knowledge, only the

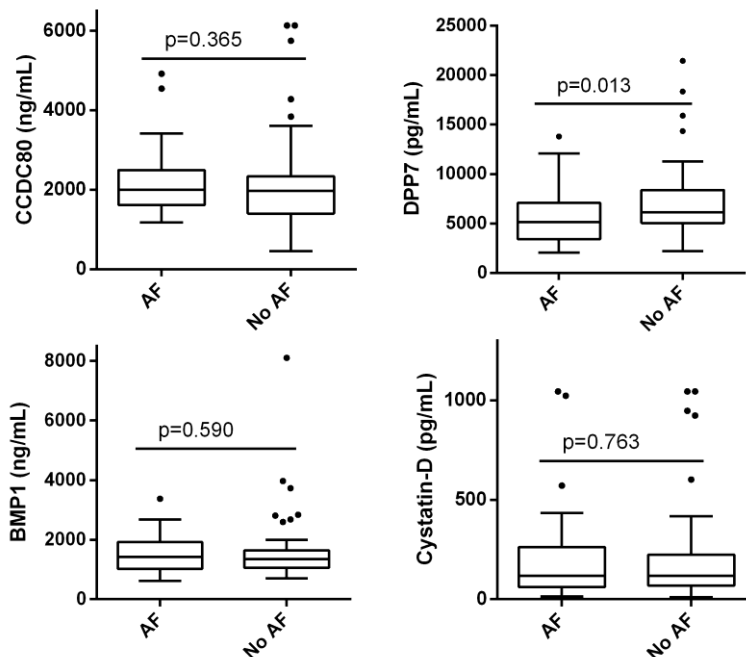
study of Lambert et al. included stroke patients [21]. This study explored 184 proteins in patients with previously known causes of stroke. In contrast, we evaluated a wider range of proteins in patients with ESUS to ascertain new predictors of AF. Although all the patients included in our study had no prior story of AF, we cannot differentiate between new-onset AF or first-diagnosed AF. However, we aimed to identify AF cases in cryptogenic stroke patients independently of the onset of this AF because, from a clinical perspective, the treatment of the arrhythmia is the same.

Regarding the proteins differentially expressed in our analysis when comparing patients with and without AF, we should highlight that natriuretic peptides, NT-proBNP and BNP, were in the top-ranked positions. Both are well-known surrogates of AF and have already been validated in the present cohort of cryptogenic patients [8]. Therefore, we decided to test other proteins with similar nominal p-values in the comparison. Only

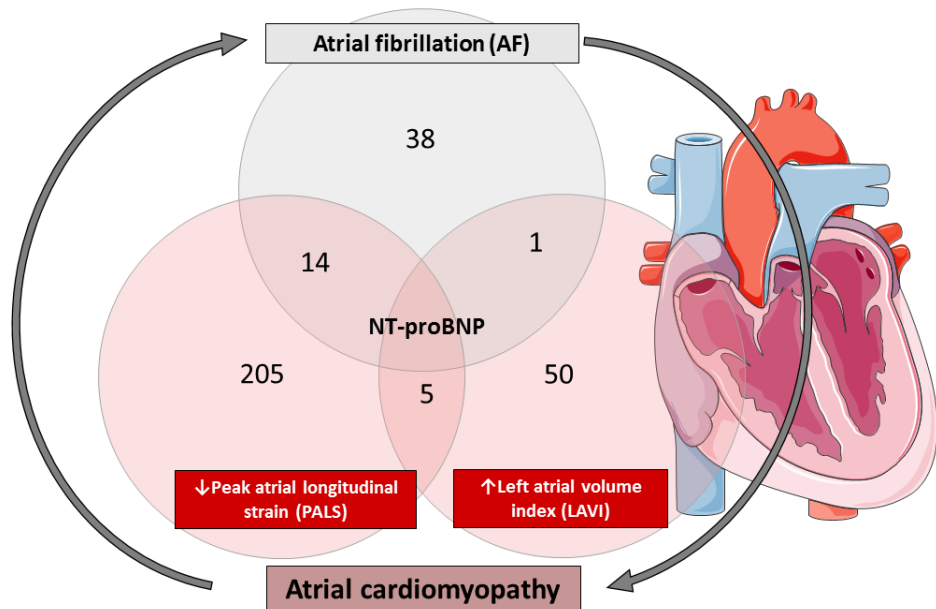
DPP7 showed significant differences in the validation from the four proteins selected, with higher levels in the patients without AF. DPP7 (also called DPP2) is a member of the dipeptidyl peptidase family, which has been implicated in many immunologic processes. Although limited data about DPP7 is available compared to other family members, there is a substantial overlap in this family regarding substrate specificity, inhibitors, and functions.

Interestingly, members of the dipeptidyl peptidase family have been linked to atherosclerosis and are considered therapeutic targets for treating this pathology [22]. Therefore, the increase of DPP7 levels in no AF individuals might be linked to an underlying atherosclerotic aetiology in those ESUS cases, but this should be confirmed.

Another hypothesis would be that DPP7 had a role in the pathophysiology of AF, lowering its risk. DPP7 is a lysosomal protein ubiquitously distributed in various tissues and organs, including the heart[23].



**Figure 2.** Boxplot distribution of CCDC80, DPP7, BMP1 and Cystatin-D between AF and no AF. P-values indicated correspond to the Mann-Whitney test. P-values were not corrected by Bonferroni, which lowered the significance threshold to  $p < 0.0125$ . Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. The line in the middle is plotted as the median. Whiskers are drawn according to Tukey methodology ( $\pm 1.5$  IQR), and larger values are plotted as individual points.



**Figure 3. Summary of proteins altered in AF and atrial myopathy.**

The numbers in the circles indicate proteins related to each variable (AF, PALS, and LAVI). Proteins in the overlap circles are those commonly related to two or three variables. The number of proteins related to PALS and LAVI shown in the figure corresponds to those with significant correlations. The number of proteins related to AF corresponds to those significant in the comparison AF vs no AF. In all cases, nominal p-values were considered.

Its pathophysiological significance requires additional study, including measurements on atrial tissue and/or biological experiments.

Although DPP7 adds information to current markers (clinical, echocardiographic, and blood biomarkers previously described like NT-proBNP), the logistic regression models presented here were built with reduced sample size. Therefore, the use of DPP7 as a biomarker should be validated in further studies. The fact that the other candidates were not validated indicates that the present discovery approach resulted in several false positives. We cannot discard the possibility that the lack of validation is due to disparity in results between the two techniques used, as previous studies presented weak correlations ( $r < 0.3$ ) in some proteins between SOMAscan platform and conventional immunoassays [24]. The low reproducibility between techniques may be explained as binding reagents interacting with different epitopes of a specific analyte. That is why discovery studies aiming to find biomarker candidates should include validations with different techniques. More importantly, the difficulty to find

new AF biomarkers with “discovery” strategies may be due to the complexity of AF, which makes it challenging to classify the patients in a binary variable. First, we cannot discard there were false-negative cases in the no AF group as cardiac monitoring might not have been prolonged enough to detect some AF cases [25]. Also, AF could be just a bystander, and atrial dysfunction is the real underlying disease that causes stroke susceptibility [26].

Consequently, there is a need to search for biomarkers that identify not only AF but also the underlying atrial substrate. Therefore, and taking advantage of the availability of well-phenotyped patients by echocardiography, we have explored circulating proteins and functional pathways that might be associated with atrial cardiomyopathy. Two echocardiographic variables have been considered to perform this analysis: LAVI and PALS. Although evaluating different characteristics of the left atria, both variables are used to identify atrial myopathy and have been shown useful to predict AF [3]. LAVI measures the enlargement of the atria



while PALS provides information on its deformability, but both variables are highly related.

Interestingly, in our analysis, while many proteins and pathways were altered in patients with lower PALS, few were affected in patients with high LAVI. This may reflect that more pathophysiological changes are behind the remodelling that results in atrial distensibility impairment compared to atrial enlargement. Previous studies stated that PALS measurements were more sensitive than volumetric measurements to predict AF and that LA dysfunction may precede and/or be independent of anatomical changes like LA enlargement [27]. This may also explain why few protein candidates are associated with both variables in our analysis.

The bioinformatics analysis revealed some interesting pathways playing a role in AF and atrial cardiomyopathy. The study highlighted the importance of the inflammatory response in AF, especially the role of lymphocytes and chemokine signalling. This confirms the role of inflammation in the initiation and maintenance of AF, which has extensively been described [28]. Also, we found an enrichment of growth factors signalling, which can also be linked to the inflammatory response or the fibrosis occurring in the heart [29]. Finally, calcium handling is essential for the correct electrical functioning of the heart, and similarly of what we found, abnormal calcium handling can lead to cardiac arrhythmias like AF [30].

On the other hand, several pathways were downregulated in the AF group compared to the no AF group, which could be related to other stroke etiologies in the second group. This is the case of interleukin-12 (IL-12) signalling. Interleukin-12 family members have been related to various cardiovascular diseases, including atherosclerosis, hypertension, aortic dissection, and several cardiac pathologies [31]. Also, in patients without AF, we found an upregulation of vesicle-mediated intracellular transport and activity of scavenger receptors, which are membrane-bound receptors that bind a variety of ligands, including low-density-lipoproteins (LDL). These, together with the transport of small molecules, are pathways that might describe increased levels of LDL, involved in atherosclerosis, in patients without AF.

#### 4.1. Study limitations

The present study has several limitations. The main limitation is the small sample size, limiting our statistical power to correct multiple comparisons. Second, the selection of patients was performed according to AF diagnosis, and then a posterior exploratory analysis according to echocardiographic variables was performed. As continuous variables, correlations between the echocardiographic variables and protein levels were assessed, but we should consider the difficulties of obtaining significant correlations with a reduced sample size. The same reason precluded sex- and age-based analysis. Therefore, we cannot eliminate the effect of age on the proteins/pathways revealed, especially in the case of left atrial strain that correlates with age. Nevertheless, we may not be interested in eliminating this effect as fibrosis of the atrium is a cumulative process that may result from pathways altered with age [32].

Similarly, LAVI is larger in women than in men in our cohort, and the association of some proteins' abundance with LAVI may reflect sex differences in our population. Therefore, these results need to be interpreted as hypotheses-generating. Selection of patients according to extreme PALS and LAVI matched by sex and age and validation of altered markers in a cohort with a longer follow-up would provide further insights. Moreover, we should state that LAVI and PALS might not be specific markers of atrial cardiomyopathy. Other parameters and techniques can be used to characterize the disease in other studies (e.g., left atrial voltage mapping, late gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging, and histological analysis).

Also, the lack of a matched set of similar aged non-stroke patients limits insight into biomarkers specifically associated with stroke. Finally, we only analyzed a small portion of the full proteome, which may have conditioned our findings.

## 5. Conclusions

The present study revealed multiple proteins and pathways that may have a role in the development of atrial fibrillation. In particular, the role of DPP7 as a biomarker for stroke aetiology should be further explored. Also, we have proposed a strategy considering echocardiographic parameters to discover new biomarkers and pathways that may have a role in atrial fibrillation and atrial myopathy.

In this regard, the present study may be considered hypothesis-generating.

## 6. References

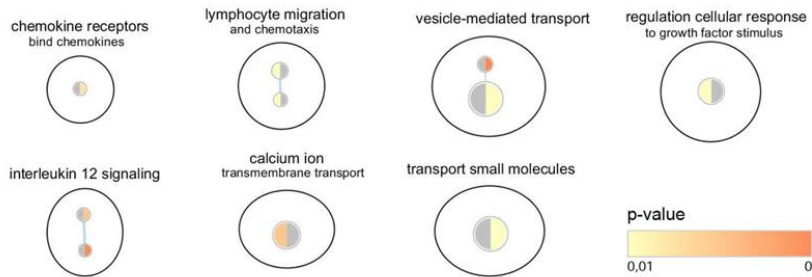
- 1 Freedman B, Potpara TS, Lip GYH. Stroke prevention in atrial fibrillation. *Lancet* 2016;388:806–17. doi:10.1016/S0140-6736(16)31257-0
- 2 Schnabel RB, Haessler KG, Healey JS, et al. Searching for atrial fibrillation poststroke: A white paper of the AF-SCREEN International Collaboration. *Circulation* 2019;140:1834–50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040267
- 3 Goldberger JJ, Arora R, Green D, et al. Evaluating the atrial myopathy underlying atrial fibrillation: Identifying the arrhythmogenic and thrombogenic substrate. *Circulation* 2015;132:278–91.
- 4 Elkind MSV. Atrial cardiopathy and stroke prevention. *Curr Cardiol Rep* 2018;20. doi:10.1007/s11886-018-1053-0
- 5 Kamel H, Longstreth WT, Tirschwell DL, et al. The Atrial cardiopathy and antithrombotic drugs in prevention after cryptogenic stroke randomized trial: Rationale and methods. *Int J Stroke* 2019;14:207–14. doi:10.1177/1747493018799981
- 6 Jordan K, Yaghi S, Poppas A, et al. Left atrial volume index is associated with cardioembolic stroke and atrial fibrillation detection after embolic stroke of undetermined source. *Stroke* 2019;50:1997–2001. doi:10.1161/STROKEAHA.119.025384
- 7 Pagola J, González-Alujas T, Flores A, et al. Left atria strain is a surrogate marker for detection of atrial fibrillation in cryptogenic strokes. *Stroke* 2014;45. doi:10.1161/STROKEAHA.114.005540
- 8 Palà E, Pagola J, Juega J, et al. BNP over NT-proBNP to predict incident atrial fibrillation after cryptogenic stroke. *Eur J Neurol* 2020;:ene.14579. doi:10.1111/ene.14579
- 9 Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, et al. Yield of atrial fibrillation detection with Textile Wearable Holter from the acute phase of stroke: Pilot study of Crypto-AF registry. *Int J Cardiol* 2018;251:45–50. doi:10.1016/j.ijcard.2017.10.063
- 10 Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, et al. Large vessel occlusion is independently associated with atrial fibrillation detection. *Eur J Neurol* 2020;27:1618–24. doi:10.1111/ene.14281
- 11 Donal E, Lip GYH, Galderisi M, et al. EACVI/EHRA Expert Consensus Document on the role of multi-modality imaging for the evaluation of patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2016;17:355–83. doi:10.1093/ehjci/jev354
- 12 Pathan F, D’Elia N, Nolan MT, et al. Normal ranges of left atrial strain by speckle-tracking echocardiography: A systematic review and meta-analysis. *J Am Soc Echocardiogr* 2017;30:59–70.e8. doi:10.1016/j.echo.2016.09.007
- 13 Gold L, Ayers D, Bertino J, et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0015004
- 14 Candia J, Cheung F, Kotliarov Y, et al. Assessment of variability in the SOMAscan assay. *Sci Rep* 2017;7:1–13. doi:10.1038/s41598-017-14755-5
- 15 Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3. doi:10.2202/1544-6115.1027
- 16 Reimand J, Isserlin R, Voisin V, et al. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* 2019;14:482–517. doi:10.1038/s41596-018-0103-9
- 17 Markus A, Valerie S, Mira K. Promising biomarker candidates for cardioembolic stroke etiology. A brief narrative review and current opinion. *Front Neurol* 2021;12:1–10. doi:10.3389/fneur.2021.624930
- 18 Ko D, Benson MD, Ngo D, et al. Proteomics profiling and risk of new-onset atrial fibrillation: Framingham heart study. *J Am Heart Assoc* 2019;8. doi:10.1161/JAHA.118.010976
- 19 Lind L, Sundström J, Stenemo M, et al. Discovery of new biomarkers for atrial fibrillation using a custom-made proteomics chip. *Heart*

- 2017;103:377–82. doi:10.1136/heartjnl-2016-309764
- 20 Zhong WY, Yang H, Wang YL, et al. Proteomic profiles of patients with atrial fibrillation provide candidate biomarkers for diagnosis. *Int J Cardiol* 2021;344:205–12. doi:10.1016/j.ijcard.2021.09.047
- 21 Lambert AT, Kong XY, Ratajczak-Tretel B, et al. Biomarkers associated with atrial fibrillation in patients with ischemic stroke: A pilot study from the NOR-FIB Study. *Cerebrovasc Dis Extra* 2020;10:11–20. doi:10.1159/000504529
- 22 Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, et al. The dipeptidyl peptidase family, prolyl oligopeptidase and prolyl carboxypeptidase in the immune system and inflammatory disease, including atherosclerosis. *Front Immunol* 2015;6:1–18. doi:10.3389/fimmu.2015.00387
- 23 Maes MB, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clin Chim Acta* 2007;380:31–49. doi:10.1016/j.cca.2007.01.024
- 24 Raffield LM, Dang H, Pratte KA, et al. Comparison of proteomic assessment methods in multiple cohort studies. *Proteomics* 2020;20:1–34. doi:10.1002/pmic.201900278
- 25 Sanna T, Diener H-C, Passman RS, et al. Cryptogenic stroke and underlying atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2014;370:2478–86. doi:10.1056/nejmoa1313600
- 26 Freedman B, Kamel H, van Gelder IC, et al. Atrial fibrillation: Villain or bystander in vascular brain injury. *Eur Hear Journal, Suppl* 2021;22:M51–9. doi:10.1093/EURHEARTJ/SUAA166
- 27 Gan GCH, Ferkh A, Boyd A, et al. Left atrial function: Evaluation by strain analysis. *Cardiovasc Diagn Ther* 2018;8:29–46. doi:10.21037/cdt.2017.06.08
- 28 Hu YF, Chen YJ, Lin YJ, et al. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 2015;12:230–43. doi:10.1038/nrcardio.2015.2
- 29 Nattel S. Molecular and cellular mechanisms of atrial fibrosis in atrial fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* 2017;3:425–35. doi:10.1016/j.jacep.2017.03.002
- 30 Lip GYH, Fauchier L, Freedman SB, et al. Atrial fibrillation. *Nat Rev Dis Prim* 2016;2:1–26. doi:10.1038/nrdp.2016.16
- 31 Ye J, Wang Y, Wang Z, et al. Roles and mechanisms of Interleukin-12 Family members in cardiovascular diseases: Opportunities and challenges. *Front Pharmacol* 2020;11:1–12. doi:10.3389/fphar.2020.00129
- 32 Pagola J, Gonzalez-alujas T, Alvarez-sabin J. Predicting atrial fibrillation with high risk of embolization with atrial strain and NT-proBNP. *Transl Stroke Res* 2021;12:735–741. doi:10.1007/s12975-020-00873-2

# Proteins and pathways in atrial fibrillation and atrial cardiomyopathy underlying cryptogenic stroke

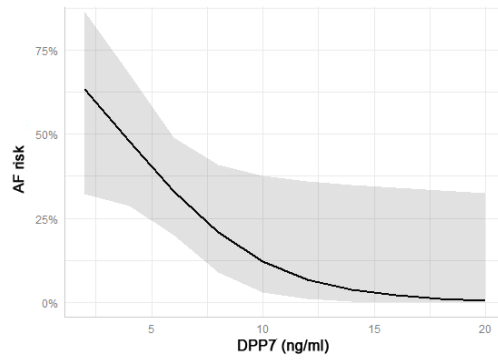
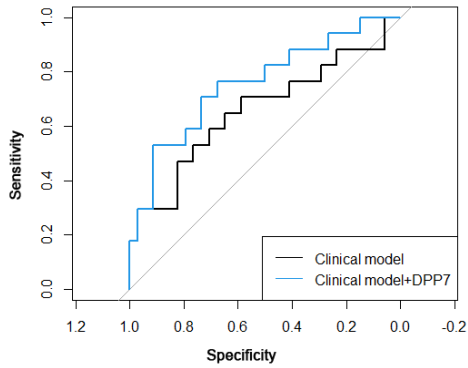
Elena Palà, Jorge Pagola, Jesus Juega, Jaume Francisco-Pascual, Anna Penalba, Maite Rodríguez, Mercedes De Lera Alfonso, Juan F. Arenillas, Juan Antonio Cabezas, Francisco Moniche, Reyes de Torres, Soledad Perez-Sanchez, Teresa González-Alujas, Carlos A. Molina, Alejandro Bustamante, Joan Montaner

## SUPPLEMENTAL INFORMATION



### Supplemental Figure 1. Pathways altered in AF.

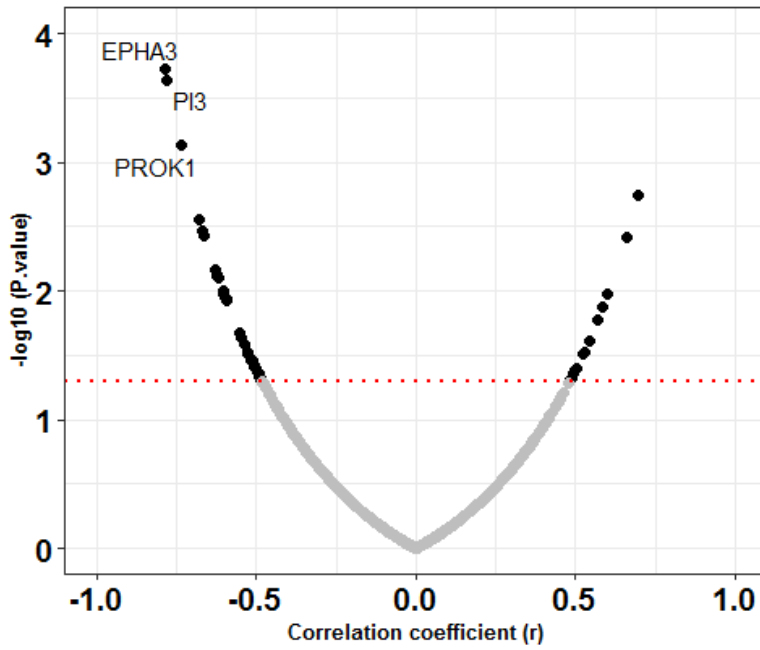
Each circle represents a pathway significantly enriched (at  $q\text{-value} < 0.25$ ). Circles are divided in two parts, the colored part indicates the database where the gene set belongs (left GO Biological processes and right Reactome). Color intensity represents p-values. Clusters of similar pathways representing major biological themes were automatically defined and summarized using the AutoAnnotate Cytoscape application. Gene overlap interconnects the nodes.



**Supplemental Figure 2. Performance of DPP7 in a logistic regression model**

The left panel shows the Receiver Operating Characteristic Curve of a clinical model built with variables associated with AF (Age, sex, LAVI, PALS and NTproBNP) and the performance of the same model after the addition of DPP7. The right panel shows the AF average predicted risk and its confidence interval of the previous model according to DPP7 values.

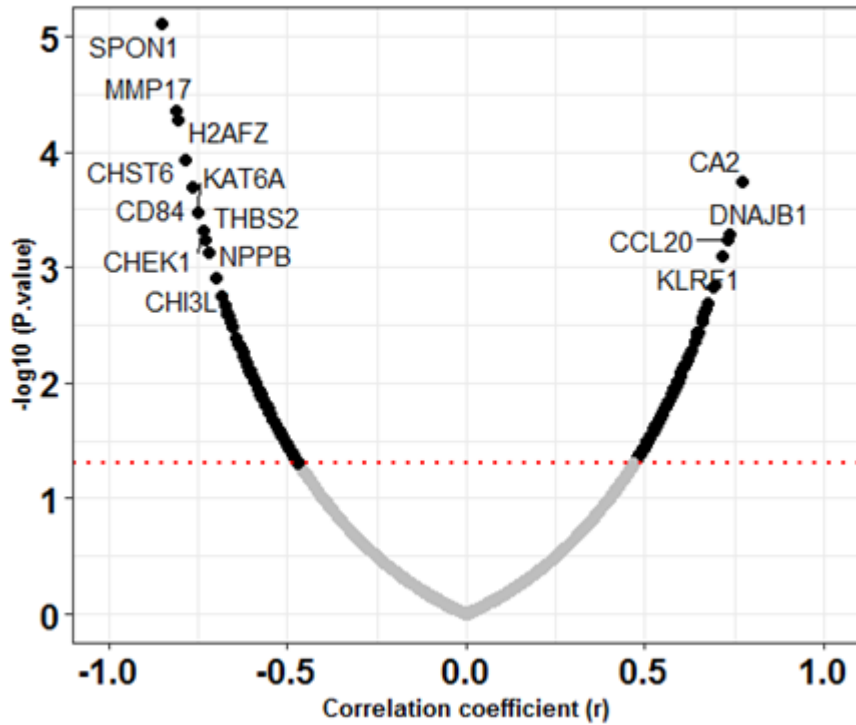
# LAVI



**Supplemental Figure 3. Volcano plot of proteins correlated to LAVI**

Black dots above the red line indicate proteins with significant correlations while grey dots below the red line indicate not significant ones according to nominal  $p$ -value  $< 0.05$ . Labeled proteins are those with a  $|\text{correlation coefficient}| > 0.7$ .

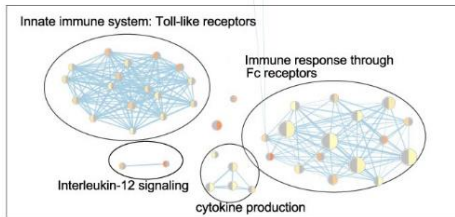
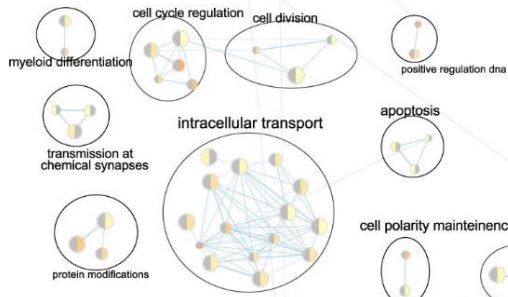
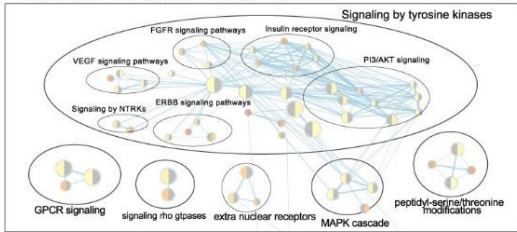
# PALS



**Supplemental Figure 4. Volcano plot of proteins correlated to PALS**

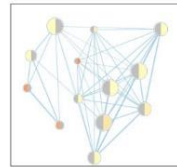
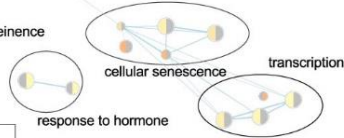
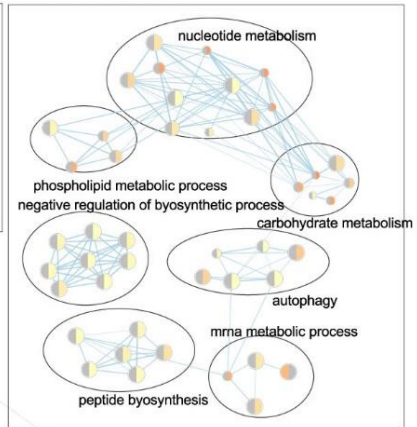
Black dots above the red line indicate proteins with significant correlations while grey dots below the red line indicate not significant ones according to nominal  $p\text{-value} < 0.05$ . Labeled proteins are those with a  $|\text{correlation coefficient}| > 0.7$ .

## SIGNAL TRANSDUCTION



## IMMUNE RESPONSE

## METABOLISM



## HEMOSTASIS/BLOOD COAGULATION



**Supplemental Figure 5. Altered pathways related to PALS.**

Each circle represents a pathway significantly enriched (at  $q$ -value $<$ 0.25). Circles are divided in two parts, the colored part indicates the database where the gene set belongs (right GO Biological processes and left Reactome). Colour intensity represents  $p$ -values. Clusters of similar pathways representing major biological themes were automatically defined and summarized using the AutoAnnotate Cytoscape application. Gene overlap interconnects the nodes.



**Supplemental Table 1. Top table of the differential expressed proteins between AF and no AF.** Excel file Supplementaltables.xlsx

**Supplemental Table 2. Clinical characteristics of the patients included in the validation study**

	All (n=111)	AF (n=44)	No AF (n=67)	p-value
<b>Sex (%female)</b>	54 (50%)	21 (51.2%)	33 (49.3%)	0.84
<b>Age (years)</b>	79 (73-83)	78 (73.25-82.75)	79 (71-84)	0.97
<b>Hypertension</b>	88 (82.2%)	32 (78%)	56 (84.8%)	0.37
<b>Diabetes</b>	20 (19.6%)	8 (21.6%)	12 (18.5%)	0.70
<b>Vasculopathy</b>	20 (18.2%)	8 (18.2%)	12 (18.2%)	1.00
<b>Renal failure</b>	9 (8.2%)	3 (6.8%)	6 (9.1%)	0.74
<b>COPD</b>	10 (10.9%)	2 (5.6%)	8 (14.3%)	0.30
<b>Obesity</b>	17 (18.1%)	9 (24.3%)	8 (14%)	0.20
<b>Heart disease</b>	33 (30.6%)	14 (34.1%)	19 (28.4%)	0.53
<b>Basal NIHSS</b>	4 (1-7)	3 (1-7)	5 (1-7)	1.00
<b>LVEF (%)</b>	62.94 ± 8.93	62.63 ± 10.20	63.16 ± 8.01	0.76
<b>PALS (%)</b>	25.34 ± 9.25	22.16 ± 8.95	27.59 ± 8.89	0.014
<b>LAVI (ml/m<sup>2</sup>)</b>	29 (23-36)	31 (25.5-37)	26 (22-35.25)	0.056
<b>Number of AF episodes</b>		9 (3-34)		
<b>Longest AF episode (minutes) (n=31)</b>		704 (133.65-1432)		

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; LVEF, left ventricular ejection fraction; PALS, peak atrial longitudinal strain; LAVI, left atrial volume index.

**Supplemental Table 3. Biomarker levels and comparisons between different groups.**

<b>Protein name</b>	<b>AF</b>	<b>No AF</b>	<b>P-value</b>
<b>Coiled-coil domain-containing protein 80 (ng/mL)</b>	1995.06 (1615.15-2495.05)	1975.51 (1398.52-2336.98)	0.365
<b>Dipeptidyl peptidase 7 (ng/mL)</b>	5.13 (3.42-7.10)	6.16 (5.04-8.39)	0.013
<b>Bone morphogenetic protein 1 (ng/mL)</b>	1420.26 (1021.71-1919.76)	1348.97 (1051.96-1648.34)	0.590
<b>Cystatin-D (pg/mL)</b>	117.51 (61.95-262.11)	118.06 (68.27-223.36)	0.763

P-values indicated correspond to Mann-Whitney test.

Biomarker levels are expressed as median (interquartile range).

**Supplemental Table 4. Top table of protein correlations with LAVI.** Excel file Supplementaltables.xlsx

**Supplemental Table 5. Top table of protein correlations with PALS.** Excel file Supplementaltables.xlsx

**Supplemental Table 6. Pathways altered in AF according to GSEA analysis (Q-value<0.25).** Excel file Supplementaltables.xlsx



**Blood-based biomarkers to search for atrial fibrillation in high-risk asymptomatic individuals and cryptogenic stroke patients**

(Under review)

---



# Blood-based biomarkers to search for atrial fibrillation in high-risk asymptomatic individuals and cryptogenic stroke patients.

Elena Palà<sup>1</sup>, Alejandro Bustamante<sup>1,2</sup>, Jorge Pagola<sup>3</sup>, Jesus Juega<sup>3</sup>, Jaume Francisco-Pascual<sup>4,5</sup>, Anna Penalba<sup>1</sup>, Maite Rodriguez<sup>3</sup>, Mercedes De Lera Alfonso<sup>6</sup>, Juan F. Arenillas<sup>6</sup>, Juan Antonio Cabezas<sup>7</sup>, Soledad Pérez-Sánchez<sup>8</sup>, Francisco Moniche<sup>7</sup>, Reyes de Torres<sup>8</sup>, Teresa González-Alujas<sup>5,9</sup>, Josep Lluís Clúa-Espuny<sup>10,11</sup>, Juan Ballesta-Ors<sup>11</sup>, Domingo Ribas<sup>12</sup>, Juan Acosta<sup>13</sup>, Alonso Pedrote<sup>13</sup>, Felipe Gonzalez-Loyola<sup>14,15</sup>, Delicia Gentile Lorente<sup>11,16</sup>, Miguel Ángel Muñoz<sup>14,16</sup>, Carlos A. Molina<sup>2</sup>, Joan Montaner<sup>1</sup>

1. Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.
2. Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Badalona, Spain
3. Stroke Unit, Vall d'Hebrón Hospital and Autonomous University of Barcelona, Medicine Department, Barcelona, Spain
4. Arrhythmia Unit-Cardiology Department, Vall d'Hebrón Hospital, Barcelona, Spain
5. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, CIBERCV
6. Stroke Unit, University Hospital of Valladolid, Spain
7. Stroke Unit, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain
8. Stroke Unit, University Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain
9. Echocardiography Lab Cardiology Department, Vall d'Hebrón Hospital, Barcelona, Spain
10. Equip d'Atenció Primària Tortosa Est, SAP Terres de l'Ebre, Institut Català de la Salut, Tortosa, Spain
11. Institut d'Investigació en Atenció Primària IDIAP Jordi Gol, Ebrictus Group, Spain
12. EAP Sant Pere i Sant Pau. DAP Camp de Tarragona, Institut Català de la Salut, Tarragona, Spain.
13. Department of Cardiology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain
14. Gerència Atenció Primària de Barcelona, Institut Català de la Salut, Barcelona, Spain
15. Institut d'Investigació en Atenció Primària IDIAP Jordi Gol, Unitat Suport Recerca Barcelona, Barcelona, Spain
16. Cardiology Department, Hospital Verge de la Cinta, Institut Català de la Salut, Tortosa, Spain.

\*Corresponding author: Joan Montaner

Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR),  
Hospital Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain.  
joan.montaner@vhir.org, +34 93 489 4029.

---

**Background:** Atrial fibrillation (AF) increases the risk of ischemic stroke in asymptomatic individuals and may be the underlying cause of many cryptogenic strokes. We aimed to test the usefulness of promising blood-biomarkers related to AF pathophysiology in two prospective cohorts representative of those populations. **Methods:** 492 patients from two studies were included: 274 subjects aged 65-75 years with hypertension and diabetes from the AFRICAT cohort, and 218 cryptogenic stroke patients aged >55 years from the CRYPTO-AF cohort. AF was assessed by 4 weeks of monitoring with a wearable Holter device (Nuubo™). Blood was collected immediately before monitoring started. 10 candidate biomarkers were measured by automated immunoassays (Roche, Penzberg) in the plasma of all patients. Univariate and logistic regression analyses were performed in each cohort separately. **Results:** AF prevalence was 12.4% and 22.9% in the respective cohort. 4 biomarkers were significantly increased in asymptomatic individuals with AF (Troponin-T, Ang-2, ESM-1, and total NT-proBNP) and 7 biomarkers showed significantly higher concentrations in cryptogenic stroke patients with AF detection (GDF-15, IL-6, Troponin-T, Ang-2, BMP-10, DKK-3, and total NT-proBNP). The combination of Ang-2 and total NT-proBNP showed the best performance in both cohorts and, when corrected by age and sex, had an AUC of 0.798 (0.715-0.882) to detect AF in high-risk asymptomatic individuals, and 0.753 (0.681-0.825) in cryptogenic stroke patients. **Conclusions:** Blood-biomarkers, in particular, total NT-proBNP and Ang-2, were increased in AF patients and could be useful in AF screening strategies in the primary care setting, and also for searching AF after cryptogenic stroke.

---

## 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) increases the risk of ischemic stroke in asymptomatic individuals and may be the underlying cause of many cryptogenic strokes [1]. Anticoagulant therapy is the most effective treatment to reduce stroke risk in the presence of

AF [2], but this arrhythmia is usually underdiagnosed and, therefore, undertreated. Pre- and post-stroke AF searching would increase AF detection, and subsequently the number of patients that would benefit from primary and secondary stroke prevention treatments [3,4].

Some proteins increase in AF individuals and may be useful as AF biomarkers. Until now, natriuretic peptides (B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-B type natriuretic peptide (NT-proBNP))[5,6] are some of the most promising candidates, given their high expression in the atrium under pressure[7], and its correlation with atrial enlargement observed in AF[8]. However, natriuretic peptides typically also increase in other cardiac settings of increased filling pressure (such as heart failure), so that other biomarkers need to be explored. AF pathophysiology has been described to include atrial and vascular changes, such as inflammation, myocyte injury, collagen and lipid infiltration. Therefore, interleukin 6 (IL-6), Troponin-T, growth differentiation factor 15 (GDF-15), and fibroblast growth factor 23 (FGF-23), markers of inflammation, myocardial damage, oxidative stress, and atrial fibrosis respectively, have been extensively associated with AF occurrence, recurrence, and/or AF prognosis [9].

There are other proteins, that although the literature concerning AF is scarcer, are interesting candidates to be further tested. Endocan (ESM-1) is a marker of inflammation and endothelial dysfunction proposed as a new biomarker for the prediction of stroke risk among patients with AF [10]. Bone morphogenic protein 10 (BMP-10) is an atrial-specific protein that plays an important role in heart development and predicts AF recurrence after ablation [11]. Angiopoietin-2 (Ang-2) is an endothelial growth factor reported to be increased in AF[12–14]. Dickkopf-related protein 3 (DKK-3) is involved in heart development and cardiac hypertrophy protection and, in AF patients, elevated levels have been found in the atrial appendages and in circulation [15,16]. Finally, insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP-7) is a marker of myocardial damage that has been independently associated with chronic heart failure in AF patients [17].

In the present study, we aimed to test the performance of promising blood-biomarkers to detect AF in two prospective cohorts: one with asymptomatic high-risk subjects and the other with cryptogenic stroke patients (Figure 1).

## **2. Material and methods**

### **2.1. Subjects**

#### **2.1.1. AFRICAT study**

Asymptomatic individuals between 67-75 years old with hypertension and diabetes were included in the AFRICAT cohort [6]. Individuals with chronic inflammatory diseases, cancer, or dementia were excluded. AF diagnosis was assessed by a baseline 12-lead electrocardiogram (ECG), 28 days monitoring with a wearable Holter device (Nuubo™), and/or medical history. From the 359 patients included in the cohort, those without blood samples (n=2), and/or short/bad quality Holter registers from the no AF group (n=83) were excluded. In total, 274 individuals were analyzed in the present study. AF burden was calculated from the Holter records as minutes being in AF divided by the total minutes of readable records and was expressed as a percentage. Plasma NT-proBNP measurements were available from all the patients included [6].

The AFRICAT study protocol was approved by the clinical research ethics committees of IDIAP Jordi Gol (P15/047) and Hospital Universitari Vall d'Hebron [PR (AG) 133-2015]. All participants signed informed consent before inclusion. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

#### **2.1.2. CRYPTO-AF study**

Cryptogenic ischemic stroke patients (<72 h after stroke) over 55 years of age were included in the CRYPTO-AF cohort [16]. All patients underwent complete etiological workup before the cryptogenic stroke classification (ECG, Doppler ultrasound study of the extracranial and intracranial arteries, routine transthoracic echocardiography, and in-hospital ECG continuous automatic monitoring). Patients with known causes of stroke, previous AF, pacemaker carriers, moderate or severe disability after stroke (modified Rankin Scale score > 3), and those with clinical worsening were excluded. Patients were monitored for 28 days to detect AF with a wearable Holter device (Nuubo™) starting within the first 72 h from stroke symptoms. From the 296 patients included in the cohort, 264 completed the Holter monitoring period and 218 had available blood samples which were analyzed in the present study. The number of AF episodes and the longest AF episode in the Holter register were used as AF burden measures in this cohort.

**Table 1. AF univariate analysis of the two included cohorts**

	AFRICAT			CRYPTO-AF		
	AF (n=34)	No AF (n=240)	P- value	AF (n=50)	No AF (n=168)	P- value
Age	70 (67.5-74)	71 (68.25-73)	0.351	78 (73-83)	73 (67-81)	0.005
Sex (%female)	14 (41.2%)	117 (48.8%)	0.408	25 (50%)	83 (49.7%)	0.970
Hypertension	34 (100%)	240 (100%)	1.00	39 (78%)	128 (77.1%)	0.895
Diabetes	34 (100%)	240 (100%)	1.00	11 (24.4%)	37 (23.4%)	0.886
Ischaemic cardiopathy	9 (26.5%)	43 (17.9%)	0.234	3 (6%)	11 (6.5%)	1.000
Heart failure*	3 (8.8%)	13 (5.4%)	0.431	1 (2.1%)	3 (2.5%)	1.000
LAVI	-	-	-	31 (28-39)	27 (23-32.8)	0.002
LAS	-	-	-	21.33±19.69	28.64±9.83	<0.001
BNP (pg/ml)	-	-	-	90.70 (49.87-162.30)	33.65 (14.85-81.87)	<0.001
NT-proBNP (pg/ml)	380.60 (123.97-1285.50)	112.70 (61.10-206.15)	<0.001	425.95 (226-816.87)	215.90 (99.09-463.85)	<0.001
GDF-15 (pg/ml)	2367.00 (1329.25-3198.75)	2491 (1633.5-3583.00)	0.375	1896.5 (1521.5-2659.5)	1645.5 (1169.5-2356.5)	0.019
IL-6 (pg/ml)	3.64 (2.07-4.91)	3.15 (1.87-4.89)	0.334	11.19 (4.64-20.77)	7.28 (2.84-15.28)	0.042
TroponinT (pg/ml)	16.89 (11.77-23.88)	12.88 (9.73-18.85)	0.011	17.19 (14.27-28.09)	15.11 (10.26-20.95)	0.002
Ang-2 (ng/ml)	2.46 (1.76-4.11)	1.67 (1.37-2.14)	<0.001	2.43 (1.60-3.68)	1.68 (1.32-2.31)	<0.001
BMP-10 (ng/ml)	2.24 (1.84-2.68)	2.06 (1.86-2.31)	0.079	2.26 (1.92-2.53)	2.05 (1.79-2.33)	0.013
DKK3 (ng/ml)	55.84 (51.05-66.29)	54.33 (47.00-66.11)	0.413	62.78 (55.52-79.56)	55.61 (49.37-65.10)	0.001
ESM-1 (pg/ml)	2087.75 (1831.47-2460.95)	1815.55 (1482.70-2297.15)	0.012	2750.00 (2025.17-3280.00)	2268.80 (1846.80-3226.90)	0.101
FGF-23 (pg/ml)	167.73 (129.75-257.84)	148.80 (118.39-206.60)	0.071	134.04 (110.00-204.46)	134.74 (102.11-185.65)	0.583
IGFBP-7 (ng/ml)	115.66 (99.83-132.21)	107.53 (94.91-128.29)	0.088	104.42 (85.50-116.84)	94.68 (82.11-109.56)	0.052
Total NT-proBNP (pg/ml)	1821.35 (749.58-4434.00)	650.93 (376.97-1159.77)	<0.001	2123.50 (1241.72-3555.57)	906.18 (419.09-1887.40)	<0.001

\*Heart failure is considered when LVEF < 40% in th CRYPTO-AF study. LAVI indicates left atrial volume index; LAS, left atrial strain.

Left atrial volume adjusted to body surface index (LAVI, ml/ m<sup>2</sup>) was measured by biplane transthoracic echocardiography in a subset of 152 patients and peak atrial longitudinal strain (PALS) was evaluated by speckle tracking software (GE EchoPAC®) in 131 patients. Plasma NT-proBNP and BNP measurements were available from all the patients included [5].

Written informed consent was obtained from all participants and the study was approved (PR (AG)49/2014) by the Ethical Committee of Vall d’Hebrón Hospital, Valladolid Hospital, Virgen Macarena Hospital and Virgen del Rocio Hospital, in line with Helsinki guidelines

## 2.2. Biomarker quantification

Blood was collected into EDTA tubes at the time of inclusion of each study. After centrifugation at 1500

g and 4°C for 15 min, plasma aliquots were frozen at -80°C until biomarker determination. Biomarkers were centrally measured and blinded to clinical data (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). GDF-15, IL-6 and Troponin-T were measured with commercial in vitro diagnostic immunoassays (Roche Diagnostics). Angiotensin-2, BMP-10, DKK-3, ESM-1, FGF-23, IGFBP-7, and total NT-proBNP (including both glycosylated and non-glycosylated forms) were quantified using a research grade prototype assay on a Cobas Elecsys e601 platform (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) employing Elecsys electrochemiluminescence technology. More details on these biomarkers are provided in the Supplemental Table 1.

## 2.3. Statistical analysis



Statistical analysis was conducted with SPSS version 20. Graphs were elaborated with GraphPad Prism 6. Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the data. Data were expressed as number (%) for categorical variables and as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range) for continuous variables, depending on the data distribution. For univariate analysis, the Mann–Whitney U-test or Student’s t-test were used for continuous variables, and the  $\chi^2$  test was used for categorical variables. ANOVA or the Kruskal–Wallis test were used to compare  $>2$  variables depending on the variable distribution. The Spearman test was used for correlations.

Samples below the limit of detection were substituted by the lowest value detected minus 0.5 for the analysis. Similarly, samples above the limit of detection were substituted by the highest value detected plus 0.5. Outliers were defined as samples with Z-scores of  $\pm 3$ . Outliers were included in the analysis but sensitivity analyses were performed excluding them.

Biomarkers were log<sub>2</sub>transformed to explore their behavior in predictive models. Forward selection with an entry criterion of  $p=0.05$  was applied to select the biomarkers to enter in the logistic regression models. Selected biomarkers were included as continuous variables in logistic regression models. Then, models were adjusted by age and sex. The area under the receiving operator curve (AUC) of the constructed models was calculated and compared using the DeLong test. The integrated discrimination improvement index (IDI) was used to compare their predictive capacity.

The PanelomiX algorithm [17] was used to select thresholds for the biomarkers identified. PanelomiX uses the iterative combination of biomarkers and thresholds to obtain the combination that provides the optimal classification performance. Two optimization options were used: optimizing global accuracy and optimizing the specificity at  $\geq 90\%$  sensitivity. Again, logistic regression models were created including the panels selected by PanelomiX adjusted by age and sex.

The analyses for the selection of the best biomarker combinations were carried out separately and independently in each of the cohorts.

The performance of the best biomarker combination was compared to the performance of biomarkers previously measured in the tested cohorts: NT-proBNP (AFRICAT and CRYPTO-AF) and BNP (which had higher accuracy than NT-proBNP in the CRYPTO-AF cohort [5]).

### 3. Results

Baseline characteristics of each cohort and biomarker results were reported in Table 1.

In the AFRICAT cohort, AF was detected in 34 subjects. AF cases were classified according to how AF diagnosis was performed in 4 groups, defined by medical history (MH) for AF, ECG findings, and Holter AF detection: 17 MH-ECG-Holter+, 7 MH-ECG+Holter+, 3 MH+ECG-Holter-, and 7 MH+ECG+. Among the analyzed molecules, 4 proteins showed significant differences when comparing asymptomatic individuals with and without AF diagnosis (Troponin-T, Ang-2, ESM-1, and total NT-proBNP)(Table 1 and Figure 2). None of them showed significant differences when comparing paroxysmal AF cases only detected during the monitoring period (MH-ECG-Holter+) vs no AF cases. Several proteins showed increased levels in the AF groups with “established AF” (MH+ECG+ or MH-ECG+Holter+)(Supplemental Figure 1). In this cohort, AF burden information was available from 27 patients. The median AF burden was 3% [0.6%-14%] and it correlated with FGF-23 ( $r=0.394$ ,  $p=0.042$ ), and Total NT-proBNP ( $r=0.525$ ,  $p=0.005$ )(Table 2).

In the CRYPTO-AF cohort, AF was detected in 50 subjects. Cryptogenic stroke patients with AF had higher levels of GDF-15, IL-6, Troponin-T, Ang-2, BMP-10, DKK-3, and total NT-proBNP, in comparison to those without AF (Table 1 and Figure 2). In this cohort, information about AF duration was available for 38 patients. Median number of AF episodes was 10 [3-34.25] and median longest AF episode was 626.12 min [130.24 min-1409.07 min]. The number of episodes correlated with the level of Ang-2, while the duration of the longest episode also correlated with GDF-15, Troponin-T, IL-6, and total NT-proBNP (Table 2). The correlations between biomarkers and left atrial function were reported in Table 2

**Table 2. Correlations between biomarkers and measures of AF burden and left atrial function**

	AFRICAT	CRYPTO-AF			
	AF burden (%) (n=27)	Number of AF episodes (n=38)	Longest AF episode (minutes) (n=38)	LAVI (left atrial volumen index) (n=152)	LAS (left atrial strain) (n=131)
GDF-15 (pg/ml)	r=0.310, p=0.115	r=0.137, p=0.412	<b>r=0.327, p=0.045</b>	<b>r=0.185, p=0.023</b>	<b>r=-0.186, p=0.034</b>
IL-6 (pg/ml)	r=-0.136, p=0.498	r=0.105, p=0.529	<b>r=0.379, p=0.019</b>	r=0.145, p=0.074	<b>r=-0.362, p&lt;0.001</b>
TroponinT (pg/ml)	r=0.359, p=0.072	r=0.054, p=0.430	<b>r=0.344, p=0.034</b>	<b>r=0.245, p=0.002</b>	<b>r=-0.322, p&lt;0.001</b>
Ang-2 (ng/ml)	r=0.244, p=0.220	<b>r=0.395, p=0.014</b>	<b>r=0.518, p=0.001</b>	r=0.159, p=0.051	<b>r=-0.302, p&lt;0.001</b>
BMP-10 (ng/ml)	r=0.362, p=0.064	r=0.096, p=0.565	r=0.100, p=0.550	<b>r=0.174, p=0.033</b>	<b>r=-0.275, p=0.002</b>
DKK3 (ng/ml)	r=0.271, p=0.171	r=0.289, p=0.078	r=0.309, p=0.059	<b>r=0.253, p=0.002</b>	<b>r=-0.295, p=0.001</b>
ESM-1 (pg/ml)	r=-0.081, p=0.691	r=0.185, p=0.267	r=0.181, p=0.276	<b>r=0.227, p=0.005</b>	<b>r=-0.221, p=0.012</b>
FGF-23 (pg/ml)	<b>r=0.394, p=0.042</b>	r=0.088, p=0.597	r=0.146, p=0.381	r=-0.003, p=0.967	r=-0.061, p=0.490
IGFBP-7 (ng/ml)	r=0.315, p=0.110	r=0.122, p=0.464	r=0.071, p=0.674	r=0.139, p=0.089	r=0.-134, p=0.127
Total NT-proBNP (pg/ml)	<b>r=0.525, p=0.005</b>	r=0.149, p=0.373	<b>r=0.376, p=0.020</b>	<b>r=0.417, p&lt;0.001</b>	<b>r=-0.415, p&lt;0.001</b>

Significant correlations are represented in bold

Total NT-proBNP, Ang-2, and Troponin-T were increased in both cohorts (Table 1 and Figure 2). When comparing the two cohorts, some biomarkers presented differential concentration: IL-6, DKK-3, ESM-1, Troponin-T and total NT-proBNP increased in the CRYPTO-AF cohort, while GDF-15, FGF-23, and IGFBP-7 decreased. These differences were only significant between the AF group for DKK-3 and between the no AF group for GDF-15, Troponin-T and total NT-proBNP (Figure 2). As the main difference between the two cohorts, apart from the stroke itself was the presence of hypertension and diabetes in all the patients included in AFRICAT cohort, the association of these pathologies with all the biomarkers was tested in the CRYPTO-AF cohort. GDF-15 (p<0.001), Troponin-T (p=0.002), FGF-23 (p=0.006) and IGFBP-7 (p=0.018) abundance was higher levels in patients with hypertension. Moreover, patients with diabetes had higher concentrations of GDF-15 (p=0.017) and Troponin-T (p=0.013), and lower concentrations of ESM-1 (p=0.048).

Sensitivity analyses were conducted excluding outliers and results were similar (Supplemental Table 2). The only remarkable differences were in the univariate analysis of the CRYPTO-AF cohort, in

which IGFBP7 was significant (p=0.030) and IL-6 was no longer significant (p=0.063).

### 3.1. Biomarker combinations

#### 3.1.1. Asymptomatic high-risk subjects

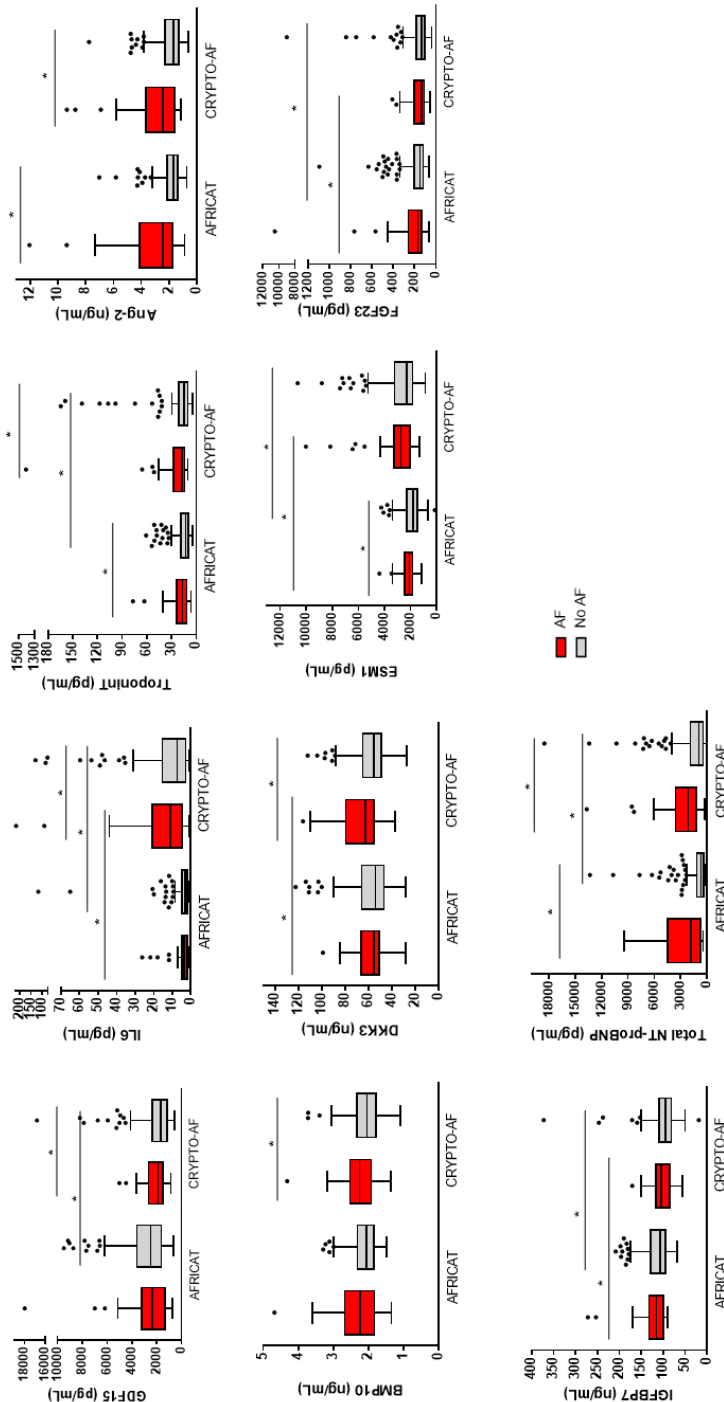
Only two biomarkers were identified as independent AF predictors: Ang-2 (OR=2.302 per fold increase [95% CI=1.16–4.57], p=0.017), and Total NT-proBNP (OR=1.708 per fold increase [1.22–2.40], p=0.002). The model including both biomarkers had an AUC of 0.778 [0.692–0.865], p<0.0001, which was better than the performance of Ang-2 alone (AUC=0.715 [0.607-0.823], p<0.001) (DeLong=0.026), but similar to the one of total NT-proBNP (AUC=0.775 [0.69-0.86], p<0.001) (DeLong=0.22)(Figure 3). Nevertheless, the combination of both biomarkers improved the discrimination capacity of each biomarker alone according to the IDI: 3.86% [0.73%-7.02%], p=0.015, when compared to Ang-2, and 4.66% [0.84%-8.48%], p=0.017, when compared to Total NT-proBNP.

After the addition of age and sex into the model, the accuracy in terms of area under the curve improved (AUC=0.798 [0.715-0.882], p<0.001), and

both biomarkers continued as independent predictors for AF detection (Figure 3 and Table 3).

A panel including Ang-2 >1.73ng/ml and Total NT-proBNP>665.86 pg/mL was selected by the

PanelomiX software as the most accurate (AUC= 0.7331) for the detection of AF in asymptomatic patients. The panel was positive when the two markers were above the cut-off (sensitivity, 76.5%; specificity, 70.8%). Alternatively, a panel including



**Figure 2. Boxplot distribution of the biomarker circulating levels in the CRYPTO-AF and the AFRICAT cohort.**

Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. The line in the middle is plotted as the median. Whiskers are drawn according to Tukey methodology ( $\pm 1.5$  IQR) and larger values are plotted as individual points. Significant comparisons are indicated with asterisk.

Ang-2 >2.613ng/ml and Total NT-proBNP>632.65 pg/mL, positive when one of the biomarkers was above the cut-off had a sensitivity of 91.2% and a specificity of 47.5% (AUC= 0.7539). The inclusion of the biomarkers as panels to the logistic regression models resulted in an AUC of 0.780 [0.702-0.859] and 0.740 [0.658-0.7822] respectively (Figure 3 and Supplemental Table 3).

### 3.1.1.1. Comparison to biomarkers previously measured in the cohort (NT-proBNP)

In the AFRICAT cohort, NT-proBNP (Roche Diagnostics) had been previously measured [6]. The pre-commercial total NT-proBNP assay, measuring all, glycosylated and non-glycosylated, forms of NT-proBNP had similar AUC (0.775 [0.69-0.86]) in comparison to conventional NT-proBNP (0.771 [0.69-86]) in the present cohort (De Long=0.807), although conventional NT-proBNP had a better discriminatory capacity (IDI=2.57%[0.213%-4.92%]). Both biomarkers presented an strong correlation (r=0.944, p<0.001)

However, when NT-proBNP was combined with Ang-2 into the logistic regression model corrected by age and sex, the accuracy was similar (AUC=0.787 [0.698-0.874], P<0.001) to the one obtained with the combination of Total NT-proBNP and Ang-2 (DeLong=0.394)(IDI = 1.32% [-0.27%-2.90%]).

### 3.1.2. Cryptogenic stroke patients

Similar to what we found in the AFRICAT cohort, Ang-2 (OR=2.274 per fold increase [95% CI=1.33–3.89], p=0.003) and Total NT-proBNP (OR=1.408 per fold increase [1.09–1.82], P =0.003) were identified as the only biomarkers that were independent predictors of post-stroke AF. The model including both biomarkers had an AUC of 0.747 [0.671–0.823], p< 0.0001, which is better than the performance of Ang-2 alone (AUC=0.697 [0.613-0.781], p<0.001) (DeLong=0.036), but similar to the one of total NT-proBNP (AUC=0.719 [0.64-0.79], p<0.001) (DeLong=0.26)(Figure 3). Nevertheless, the combination of both biomarkers improved the discrimination capacity of each biomarker alone according to the IDI: 2.93% [0.51%-5.35%],p=0.017, when compared to Ang-2, and 5.27% [1.65%-8.89%], p=0.004, when compared to Total NT-proBNP.

After the addition of age and sex into the model, the accuracy in terms of area under the curve improved (AUC=0.753[0.681-0.825], p<0.001), and only Ang-2 continued to be an independent predictor for post-stroke AF (OR=2.399 per fold increase [1.39–4.15], p=0.002)(Figure 3 and Table 3).

A panel including Ang-2 >1.26ng/ml and Total NT-proBNP>1221.4 pg/mL was selected by the

**Table 3.** Logistic Regression Analyses and Additional Predictive Value of Blood Biomarkers as continuous variables in the AFRICAT and the CRYPTO-AF cohort

	AFRICAT		CRYPTO-AF	
	Clinical model (Age+Sex)	Clinical model (Age+ Sex) + Biomarkers_continuous	Clinical model (Age+Sex)	Clinical model (Age+ Sex) + Biomarkers_continuous
<b>Logistic regression, OR (95% CI)</b>				
<b>Age</b>	0.932 (0.833-1.042), p=0.215	0.918 (0.810-1.039), p=0.174	1.060 (1.619-1.103), p=0.004	1.038 (0.990-1.089), p=0.122
<b>Sex</b>	0.781 (0.374-1.633), p=0.512	0.492 (0.207-1.174), p=0.110	0.906 (0.473-1.734), p=0.769	0.878 (0.438-1.760), p=0.714
<b>Log<sub>e</sub>Ang2</b>	-	2.538 (1.229-5.240), p=0.012	-	2.399 (1.388-4.146), p=0.002
<b>Log<sub>2</sub>TotalNTproBNP</b>	-	1.756 (1.248-2.471), p=0.001	-	1.269 (0.947-1.701), p=0.111
<b>IDI statistics</b>				
<b>Total IDI (95% CI)</b>	17.1% (8.56%-25.7%)		11.3% (6.36%-16.1%)	
<b>P-value</b>	8.92*10 <sup>-5</sup>		6.49*10 <sup>-6</sup>	
<b>ROC curve</b>				
<b>AUC</b>	0.558 (0.445-0.670)	0.798 (0.715-0.882)	0.631 (0.550-0.712)	0.753 (0.681-0.825)
<b>DeLongTest</b>		p= 0.00019		p=0.003

De Long test compared the performance of the clinical model with the biomarkers, and the clinical model alone in each cohort. AUC indicates area under the curve; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; OR, odds ratio; and ROC, receiver operator characteristic.

PanelomiX software as the most accurate (AUC= 0.7371) for the diagnosis of AF after stroke. The panel was positive when the two markers were above the cut-off (sensitivity, 76%; specificity, 70.1%). Alternatively, a panel including Ang-2 >1.26ng/ml and Total NT-proBNP>522.05 pg/mL, also positive when both biomarkers were above the cut-off, had a sensitivity of 90% and specificity of 46.1% (AUC= 0.681). The addition of the biomarker panels to the logistic regression models resulted in an AUC of 0.771 [0.708-0.834] and 0.720 [0.651-0.789] respectively (Figure 3 and Supplemental Table 3).

### 3.1.2.1. Comparison to biomarkers previously measured in the cohort (BNP and NT-proBNP)

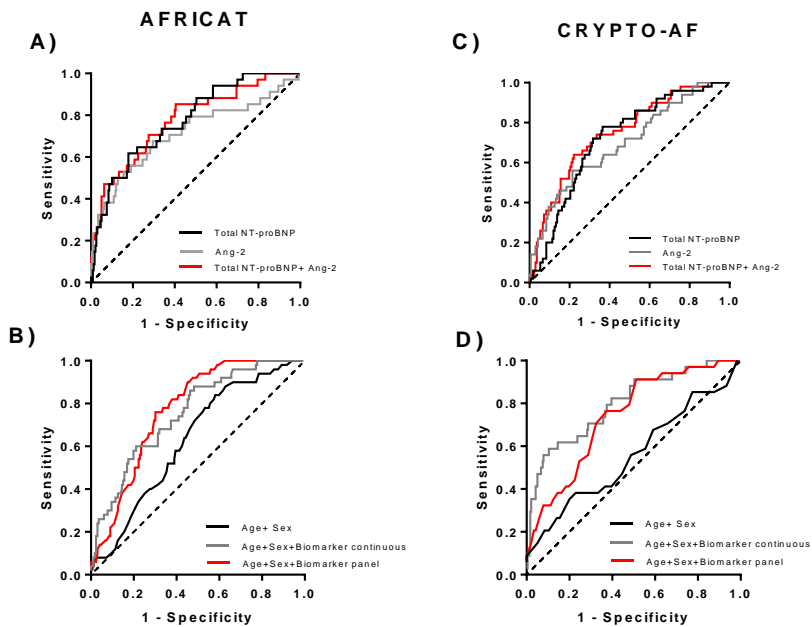
In the CRYPTO-AF cohort, NT-proBNP (Roche Diagnostics) and BNP (Siemens Healthcare) had been previously measured [5]. The pre-commercial total NT-proBNP assay had higher AUC (0.719 [0.64-

0.79]) than conventional NT-proBNP (0.668 [0.589-0.747])(DeLong=0.002)(IDI=35.3%[19.1%-51.4%]) but similar to BNP (0.722 [0.645-0.799])(DeLong=0.82)(IDI=-0.67%[-2.4%-1.06%]) in the present cohort. Conventional NT-proBNP ( $r=0.939$ ,  $p<0.001$ ) and BNP ( $r=0.839$ ,  $p<0.001$ ) presented a strong correlation with the pre-commercial assay.

Accordingly, when BNP was combined with Ang-2 into the logistic regression model corrected by age and sex, the accuracy was similar (AUC=0.763 [0.690-0.837],  $P<0.001$ ) to the one obtained with the combination of Total NT-proBNP and Ang-2 (DeLong=0.218), but the discrimination capacity was better (IDI=1.38%[2.47%-0.29%]).

## 4. Discussion

In the present study, 10 promising AF blood-biomarkers of various biological pathways described for AF pathophysiology have been



**Figure 3. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the constructed models for the two cohorts.**

Panels A and B represented the performance of the models constructed for the AFRICAT cohort. Panel C and D represented the performance of the models constructed for the CRYPTO-AF cohort. Panels A and C represented the ROC curves including Ang-2 or Total NT-proBNP alone, and both combined as continuous variables for each cohort. Panels B and D represented the ROC curves for the clinical model alone (Age+Sex) and in combination with the biomarkers as continuous variables or dichotomized according to the panel with the best accuracy.

measured in blood samples from 492 patients of two cohorts. The two selected study populations included (high-risk asymptomatic individuals and cryptogenic stroke patients) would benefit from AF diagnosis markers.

As a result, four proteins (Troponin-T, Ang-2, ESM-1, and Total NT-proBNP) showed increased levels in the asymptomatic population with AF. Also, we must highlight that the tendency for most of the markers measured was to increase in those groups where “AF burden” was higher (i.e. AF diagnosed by several methodologies), while no biomarker was able to detect paroxysmal AF in our cohort. Complementary to the biomarker abundance distribution among groups, correlations between AF burden and biomarkers were calculated, but only two biomarkers showed significant correlations (total NT-proBNP and FGF-23). However, we should highlight that the lack of registers of some of the patients of the MH+ECG+ group, which would have probably presented the highest AF burden measures, and in which monitoring was optional, reduced the statistical power of these correlations. These results are supported by other studies in which biomarkers like NT-proBNP presented higher values according to the AF burden [20]. We may hypothesize that the biomarker profiles observed reflected a more “advanced” stage of the disease, with more pathophysiological changes, such as atrial stretch and dilatation (associated with NT-proBNP release), taking place in patients with established AF, in comparison to patients with paroxysmal AF. According to a published meta-analysis, stroke risk is lower in paroxysmal AF, but still higher than in patients with sinus rhythm [21]. Therefore, the difficulty of the proteins tested to identify paroxysmal cases reduces its potential as screening biomarkers in asymptomatic populations. Conversely, almost all the proteins tested presented significantly elevated levels in patients with AF detected after a cryptogenic stroke, underlining the usefulness of biomarkers in this setting. Also, similarly to what we found in asymptomatic individuals, NT-proBNP, together with other biomarkers, such as Ang-2, correlated with AF burden measures.

Taking into account all our results together, 3 proteins (Troponin-T, Ang-2, and total NT-proBNP) presented differences in AF individuals from both

cohorts. Interestingly, Ang-2 and total NT-proBNP were AF independent predictors in both cohorts and therefore the most interesting proteins among tested candidates. These biomarkers represented different pathways affected by AF. Based on its biology, NT-proBNP and Ang-2 suggest that both atrial and vascular changes are present in AF pathophysiology. On the one hand, total NT-proBNP is released by the cardiomyocytes in response to pressure or volume overload indicating cardiac dysfunction [22]. NT-proBNP had been previously presented as one of the most promising AF biomarkers [21,23], and even validated in the two cohorts presented here [5,6]. Interestingly, this molecule has nine known O-glycosylation sites, some of them located in the central region, where most of the commercial immunoassays are directed, making the molecule almost “invisible” when glycosylated. Consequently, most assays only detect a subfraction of endogenous NT-proBNP[24] but in present study, the total NT-proBNP assay detected both glycosylated and non-glycosylated NT-proBNP forms. Apart from atrial changes (reflected by NT-proBNP), Ang-2, a marker of endothelial dysfunction, suggests that there is a pronounced vascular remodelling in AF patients which could add a further causality to the increased thromboembolic risk in AF, next to the blood stasis in the atrium generally described as major stroke risk. The contribution of endothelial injury to the stroke risk is further substantiated by the observation that restoration of the rhythm by ablation or antiarrhythmic drugs is generally not normalizing the stroke risk[25]. From the few studies that had explored this protein in AF individuals, Lip et al found significantly higher levels of Ang-2 together with other angiogenic factors, and platelets in AF patients compared to healthy controls, hypothesizing the role of this protein in the AF prothrombotic state [13,14]. Ang-2 had also been recently associated with the risk of incident AF in the Framingham cohort[12]. Although both biomarkers (Ang-2 and Total NT-proBNP) entered in the logistic regression model as independent predictors, when we compared their combined performance versus the performance of each biomarker alone, Ang-2 did not improve the AUC of Total NT-proBNP according to the DeLong test. However, the discrimination capacity of the model combining both biomarkers was better according to the IDI. This can be explained as DeLong is a more

restrictive tool, measuring differences between AUC, whereas IDI calculates the difference of average probabilities between events and non-events [26]. However, the combination of both biomarkers should be tested in other studies to ensure their additive results. Moreover, the presented cut-offs, selected automatically by the PanelomiX algorithm might serve as a reference for replication purposes in further studies. In the present study we only explored cut-offs optimizing accuracy and sensitivity. The combination of both biomarkers, if confirmed in future studies, might be used in clinical practice to screen for AF and a high sensitivity is aimed for screening purposes. Then, in those cases with elevated markers, intensive monitoring periods, and anticoagulation, in case AF is confirmed, would be recommended as primary or secondary stroke prevention strategies. Also, we must highlight that all the biomarkers were measured by automatic immunoassays which makes the translation into the clinical practice easier.

According to our results, total NT-proBNP correlated with other natriuretic peptides and their performance was similar. Also, when combined with Ang-2 and basic clinical variables, the natriuretic peptides previously tested presented similar results, with only a slightly better discriminatory capacity according to the IDI index when combined with BNP in cryptogenic stroke patients. These results reinforced the potential of the combination of Ang-2 and a natriuretic peptide as AF detection biomarkers, and its value for potential savings when used for selecting the right patients who deserve longer term follow-up with ECG monitoring to detect AF.

One of the strengths of the current study is that we measured the same proteins in two cohorts electrocardiographically monitored during one month, with the main difference that one presented a previous stroke and the other did not. Therefore, biomarker changes between cohorts may be influenced by the index stroke. In line with our results, IL-6, had been described to increase after stroke as part of the post-stroke inflammatory response with a maximum increase on day 3 [27]. Similarly, the level of NT-proBNP was known to increase after stroke within the first two days [28]. In our study, this biomarker only showed differences between cohorts in the group without

AF, and we may hypothesize that the effect of stroke on NT-proBNP is not so important in AF individuals as the biomarker is already increased in those patients. Also, previous results showed an increase in ESM-1 after stroke, although, in contrast with our study, the biomarker was tested in large-artery atherosclerotic stroke patients [29]. Moreover, differences between cohorts may be due to their baseline differences. Essentially, all the AFRICAT patients had hypertension and diabetes whereas the percentage of these pathologies was lower in the CRYPTO-AF cohort. Therefore, biomarkers with higher levels in the first study may be associated with these pathologies. Our results and previous publications supported this hypothesis for GDF-15, FGF-23, and IGFBP-7 [30–32]. Finally, another explanation is that patients with AF detected after stroke may have an increased thromboembolic risk and/or a higher degree of atrial substrate underlying AF, affecting the expression and release of several proteins. This hypothesis could explain the rise of biomarker levels in the AF group of the CRYPTO-AF cohort in comparison to the same group of the AFRICAT cohort and could be the reason why more biomarkers were increased in AF in this cohort in comparison to the general population. Furthermore, and supporting this hypothesis, most of the biomarkers tested correlate either with LAS or with LAVI, measures of enlargement, and deformability of the atria, that evaluate the atrial substrate underlying atrial fibrillation[33].

Samples in both studies were taken in a single time-point, just before the monitoring period started. However, longitudinal changes in these markers may be useful to monitor the degree of atrial substrate and search for AF[34]. Therefore, the study of serial samples should be explored in future studies as well their implementation into AI-based personalised prevention strategies and medical decisions.

The present study has several limitations that should be mentioned. First, patients were only monitored for 28 days. Longer monitoring periods would probably have detected a higher amount of AF patients [35], which were classified in the no AF group adding background noise to the analysis. Second, as two different cohorts were included, some registered variables and protocols slightly differed. This is the case of AF burden

measurement, which in the AFRICAT cohort was calculated as a percentage and in the CRYPTO-AF cohort as the number of episodes and the duration of the longest one, making the comparison difficult. Also, we did not correct the models with other variables beyond age and sex as these were the only variables measured in both cohorts that did not present missing information. As a result, although the AUC of the models presented were very good (between 0.7 and 0.8), the addition of other clinical variables or biomarkers may even improve their performance. Another limitation is that biomarkers were selected from the literature and we can not discard that other non tested proteins could perform better. Finally, the number of AF patients was limited and validation studies in larger cohorts are needed.

## 5. Conclusions

Blood-biomarkers, in particular total NT-proBNP and Ang-2, were increased in AF patients and reflect two mechanistically different pathways involved in AF pathophysiology (AF stretch and vascular changes). They could be useful in AF screening strategies in the primary care setting and for searching AF after cryptogenic stroke.

## Conflicts of interest

Neurovascular research laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR) received institutional research support from Roche Diagnostics that funded part of the present study.

JM and AB have participated in scientific advisory boards organized by ROCHE on the topic of "New biomarkers in Atrial Fibrillation".

## References

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141:e139:e596. doi:10.1161/CIR.0000000000000757
2. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians. 2007;146:857-867. doi:10.7326/0003-4819-146-12-200706190-00007

3. Freedman B. Screening for Atrial Fibrillation A Report of the AF-SCREEN International Collaboration. 2017;135:1851–1867. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026693
4. Schnabel RB, Haeusler KG, Healey JS, et al. Searching for Atrial Fibrillation Poststroke: A White Paper of the AF-SCREEN International Collaboration. *Circulation*. 2019;140: 1834–1850. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040267
5. Palà E, Pagola J, Juega J, et al. BNP over NT-proBNP to predict incident atrial fibrillation after cryptogenic stroke. *Eur J Neurol*. 2021;28:540-547. doi:10.1111/ene.14579
6. Palà E, Bustamante A, Clúa-Espuny JL, et al. N-Terminal Pro B-Type Natriuretic Peptide's Usefulness for Paroxysmal Atrial Fibrillation Detection Among Populations Carrying Cardiovascular Risk Factors. *Front Neurol*. 2019;10: 1–9. doi:10.3389/fneur.2019.01226
7. Noubiap JJ, Sanders P, Nattel S, Lau DH. Biomarkers in Atrial Fibrillation: Pathogenesis and Clinical Implications. *Card Electrophysiol Clin*. 2021;13: 221–233. doi:10.1016/j.ccep.2020.10.006
8. Ceyhun G. The relationship of the serum endocan level with the CHA2DS2-VASc score in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Egypt Hear J*. 2021;73: 4–9. doi:10.1186/s43044-021-00132-1
9. Reyat JS, Chua W, Cardoso VR, et al. Reduced left atrial cardiomyocyte PITX2 and elevated circulating BMP10 predict atrial fibrillation after ablation. *JCI Insight*. 2020;5: 1–16. doi:10.1172/jci.insight.139179
10. Ko D, Benson MD, Ngo D, et al. Proteomics Profiling and Risk of New-Onset Atrial Fibrillation: Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc*. 2019;8. doi:10.1161/JAHA.118.010976
11. Choudhury A, Freestone B, Patel J, Lip GYH. Relationship of soluble CD40 ligand to vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and tissue factor in atrial fibrillation: A link among platelet activation, angiogenesis, and thrombosis? *Chest*. 2007;132: 1913–1919. doi:10.1378/chest.07-1565



12. Freestone B, Chong AY, Lim HS, Blann A, Lip GYH. Angiogenic factors in a trial fibrillation: A possible role in thrombogenesis? *Ann Med.* 2005;37: 365–372. doi:10.1080/07853890510037392
13. Liu B, Li X, Zhao C, et al. Proteomic Analysis of Atrial Appendages Revealed the Pathophysiological Changes of Atrial Fibrillation. *Front Physiol.* 2020;11: 1–8. doi:10.3389/fphys.2020.573433
14. Piek A, Suthahar N, Voors AA, de Boer RA, Silljé HHW. A combined bioinformatics, experimental and clinical approach to identify novel cardiac-specific heart failure biomarkers: is Dickkopf-3 (DKK3) a possible candidate? *Eur J Heart Fail.* 2020;22: 2065–2074. doi:10.1002/ejhf.1988
15. Blum S, Aeschbacher S, Meyre P, et al. Insulin-like growth factor-binding protein 7 and risk of congestive heart failure hospitalization in patients with atrial fibrillation. *Hear Rhythm.* 2021;18:512-519. doi:10.1016/j.hrthm.2020.11.028
16. Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, et al. Large vessel occlusion is independently associated with atrial fibrillation detection. *Eur J Neurol.* 2020;27:1618-1624. doi:10.1111/ene.14281
17. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. PanelomiX: A threshold-based algorithm to create panels of biomarkers. *Transl Proteomics.* 2013;1: 57–64. doi:10.1016/j.trprot.2013.04.003
18. Plitt DC, Chung EH, Mounsey JP, Schwartz JD, Pursell IW, Gehi AK. Relation of atrial fibrillation burden and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Am J Cardiol.* 2013;111: 1315–1318. doi:10.1016/j.amjcard.2013.01.273
19. Noubiap JJ, Sanders P, Nattel S, Lau DH. Biomarkers in Atrial Fibrillation: Pathogenesis and Clinical Implications. *Card Electrophysiol Clin.* 2021;13: 221–233. doi:10.1016/j.ccep.2020.10.006
20. Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17: 698–717. doi:10.1038/s41569-020-0381-0
21. Markus A, Valerie S, Mira K. Promising Biomarker Candidates for Cardioembolic Stroke Etiology. A Brief Narrative Review and Current Opinion. *Front Neurol.* 2021;12: 1–10. doi:10.3389/fneur.2021.624930
22. Semenov AG, Feygina EE. Standardization of BNP and NT-proBNP Immunoassays in Light of the Diverse and Complex Nature of Circulating BNP-Related Peptides. *Advances in Clinical Chemistry.* 2018;85:1-30. doi:10.1016/bs.acc.2018.02.001
23. 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. doi:10.1002/sim
24. Perini F, Morra M, Alecci M, Galloni E, Marchi M, Toso V. Temporal profile of serum anti-inflammatory and pro-inflammatory interleukins in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci.* 2001;22: 289–296. doi:10.1007/s10072-001-8170-y
25. Fonseca AC, Matias JS, E Melo TP, et al. Time course of NT-proBNP levels after acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2013;128: 235–240. doi:10.1111/ane.12112
26. He XW, Ke SF, Bao YY, et al. Serum levels of endocan and endoglin are associated with large-artery atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta.* 2018;478: 157–161. doi:10.1016/j.cca.2017.12.040
27. Drew DA, Katz R, Kritchevsky S, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Blood Pressure in Older Adults: The Health, Aging, and Body Composition Study. *Hypertension.* 2020;76: 236–243. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14703.
28. Adela R, Mohammed SA, Kanwal A, Vishwakarma G, Reddy PNC, Banerjee SK. Elevated levels of GDF-15 is associated with increased angiotensin II in hypertensive patients with Type 2 diabetes. *Per Med.* 2016;13: 325–336. doi:10.2217/pme-2016-0030
29. Ibrahim NE, Afilalo M, Chen-Tournoux A, et al. Diagnostic and Prognostic Utilities of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-7 in Patients With Dyspnea. *JACC Hear Fail.* 2020;8: 415–422. doi:10.1016/j.jchf.2020.02.009
30. Goldberger JJ, Arora R, Green D, et al. Evaluating the Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation: Identifying the Arrhythmogenic and

Thrombogenic Substrate. *Circulation*. 2015;132: 278–91.  
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016795

31. Garg PK, Norby FL, Wang W, et al. Association of Longitudinal Changes in Cardiac Biomarkers With Atrial and Ventricular Arrhythmias (from the Atherosclerosis Risk in Communities [ARIC] Study). *Am J Cardiol*. 2021;158:45-52.  
doi:10.1016/j.amjcard.2021.07.043

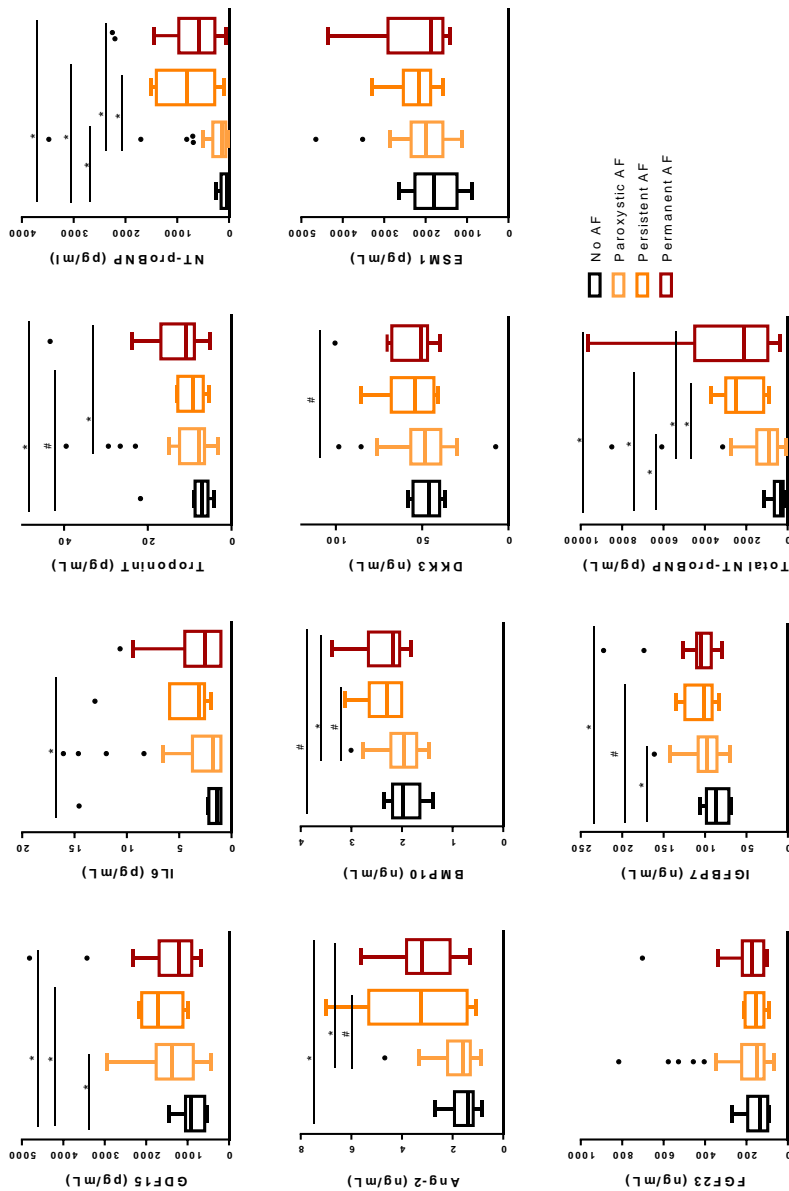
32. Diederichsen SZ, Haugan KJ, Kronborg C, et al. Comprehensive Evaluation of Rhythm Monitoring Strategies in Screening for Atrial Fibrillation: Insights from Patients at Risk Monitored Long Term with an Implantable Loop Recorder. *Circulation*. 2020;141: 1510–1522.  
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044407



# Blood-based biomarkers to search for atrial fibrillation in high-risk asymptomatic individuals and cryptogenic stroke patients

Elena Palà, Alejandro Bustamante, Jorge Pagola, Jesus Juega, Jaime Francisco-Pascual, Anna Penalba, Maite Rodriguez, Mercedes De Lera Alfonso, Juan F. Arenillas, Juan Antonio Cabezas, Soledad Pérez-Sánchez, Francisco Moniche, Reyes de Torres, Teresa González-Alujas, Josep Lluís Clúa-Espuny, Domingo Ribas, Juan Acosta, Felipe González-Loyola, Juan Ballesta-Ors, Delicia Gentile Lorente, Alonso Pedrote, Miguel Ángel Muñoz, Carlos A. Molina, Joan Montaner

## SUPPLEMENTAL INFORMATION



**Supplemental Figure 1. Plasma biomarker distributions in the AFRICAT cohort. Boxplots comparing AF groups and no AF patients.**

Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. The line in the middle is plotted as the median. Whiskers are drawn according to Tukey methodology ( $\pm 1.5$  IQR) and larger values are plotted as individual points. Significant comparisons are indicated with an asterisk.

**Supplemental Table 1: Information on the pre-commercial-assays tested**

<b>Biomarker</b>	<b>Unit</b>	<b>Description</b>	<b>Sample</b>	<b>Measurement range</b>
<b>Ang-2</b>	ng/mL	Angiopoietin-2	Plasma EDTA	0.046 - 10.4
<b>BMP-10</b>	ng/mL	Bone morphogenetic protein 10	Plasma EDTA	0.012 - 10.1
<b>DKK3</b>	ng/mL	Dickkopf-related protein 3	Plasma EDTA	0.025 - 150
<b>ESM-1</b>	pg/mL	Endocan/endothelial cell specific molecule 1	Plasma EDTA	3 - 20160
<b>FGF-23</b>	pg/mL	Fibroblast growth factor 23	Plasma EDTA	4 - 13053
<b>IGFBP-7</b>	ng/mL	Insulin-like growth factor-binding protein 7	Plasma EDTA	0.4 - 500
<b>Total NT-proBNP</b>	pg/mL	total N-terminal pro-B-type natriuretic peptide	Plasma EDTA	8.34 - 34754

**Supplemental Table 2: Sensitivity univariate analysis excluding outliers.**

	AFRICAT			CRYPTO-AF		
	AF	No AF	P-value	AF	No AF	P-value
<b>GDF-15 (pg/ml)</b>	2298 (1325.5-3077.00) n=33	2439 (1623.5-3542.5) n=236	0.295	1896.5 (1521.5-2659.5) n=50	1623.5 (1154.25-2256.25) n=164	0.008
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	3.64 (2.07-4.91) n=34	3.13 (1.85-4.84) n=238	0.292	9.95 (4.45-16.70) n=48	7.12 (2.74-14.66) n=165	0.063
<b>TroponinT (pg/ml)</b>	16.76 (11.62-21.87) n=31	12.78 (9.68-18.53) n=233	0.025	17.18 (14.23-27.12) n=49	15.11 (10.26-20.95) n=167	0.004
<b>Ang-2 (ng/ml)</b>	2.17 (1.65-3.00) n=29	1.67 (1.37-2.11) n=238	0.003	2.42 (1.60-3.31) n=47	1.68 (1.31-2.29) n=167	<0.001
<b>BMP-10 (ng/ml)</b>	2.23 (1.73-2.55) n=31	2.06 (1.86-2.31) n=240	0.331	2.24 (1.92-2.50) n=49	2.05 (1.78-2.32) n=165	0.014
<b>DKK3 (ng/ml)</b>	55.84 (51.05-66.29) n=34	53.80 (46.78-65.28) n=234	0.280	62.02 (55.51-76.23) n=48	55.18 (49.22-64.95) n=166	0.002
<b>ESM-1 (pg/ml)</b>	2087 (1828.45-2368.95) n=34	1813.90 (1480.37-2281.25) n=234	0.018	2679.75 (1969.32-3246.7) n=48	2247.5 (1837.0-3148.05) n=165	0.165
<b>FGF-23 (ng/ml)</b>	166.44 (129.53-244.63) n=33	148.80 (118.39-206.60) n=240	0.120	134.04 (110.00-204.46) n=50	134.53 (101.97-183.31) n=167	0.538
<b>IGFBP-7 (ng/ml)</b>	115.18 (99.61-124.58) n=32	107.53 (94.91-128.29) n=240	0.233	104.42 (85.50-116.84) n=50	94.50 (8.90-107.93) n=165	0.030
<b>Total NT-proBNP (pg/ml)</b>	1492.5 (743.35-3246.5) n=31	630.60 (374.34-1153.10) n=236	<0.001	2076.20 (3520.75-1238.15) n=49	859.27 (412.4-1734.22) n=164	<0.001

Values are reported as median (IQR). Sample size for each biomarker and group without outliers is indicated in the sample

**Supplemental Table 3: Logistic Regression Analyses and Additional Predictive Value of the Blood Biomarkers panels selected by PanelomiX in the AFRICAT and the CRYPTO-AF cohort**

	AFRICAT			CRYPTO-AF		
	Clinical model (Age+Sex)	Clinical model (Age+ Sex) + Biomarkers_panel_accuracy	Clinical model (Age+ Sex)+ Biomarkers_panel_sensitivity	Clinical model (Age+Sex)	Clinical model (Age+ Sex) + Biomarkers_panel_accuracy	Clinical model (Age+ Sex)+ Biomarkers_panel_sensitivity
<b>Logistic regression, OR (95% CI)</b>						
<b>Age</b>	0.932 (0.833-1.042), p=0.215	0.918 (0.814-1.035), p=0.161	0.915 (0.814-1.028), P=0.134	1.060 (1.619-1.103), p=0.004	1.032 (0.987-1.078), p=0.165	1.045 (1.002-1.091), p=0.042
<b>Sex</b>	0.781 (0.374-1.633), p=0.512	0.561 (.252-1.251), p=0.158	0.657 (0.303-1.426), P=0.288	0.906 (0.473-1.734), p=0.769	0.752 (0.372-1.520), p=0.427	0.802 (0.407-1.582), p=0.524
<b>Biomarker panel</b>		9.125 (3.846-21.85), p<0.001	10.426 (3.074-35.353), p<0.001	-	6.54 (3.051-14.032), p<0.001	6.614 (2.459-17.794), p<0.001
<b>IDI statistics</b>						
<b>Total IDI (95% CI)</b>		12.1% (7.69%-16.4%)	8.16% (5.63%-10.7%)		12.0% (7.56%-16.3%)	7.42% (4.39%-10.5%)
<b>P-value</b>		6.16*10 <sup>-8</sup>	2.49*10 <sup>-10</sup>		9.57*10 <sup>-8</sup>	1.59*10 <sup>-6</sup>
<b>ROC curve</b>						
<b>AUC</b>	0.558 (0.445-0.670)	0.780 (0.702-0.859)	0.740 (0.658-0.822)	0.631 (0.550-0.712)	0.771 (0.708-0.834)	0.720 (0.651-0.789)
<b>DeLong Test</b>		P=0.00009	P=0.00002		p=0.00018	p=0.0075

The biomarker panels included in the model were those selected by the PanelomiX tool optimizing accuracy or sensitivity. For the AFRICAT cohort the panel optimizing accuracy included Ang-2 >1.73ng/ml and Total NT-proBNP>665.86 pg/mL (positive when the two markers were above the cutoff) and the one optimizing sensitivity included Ang-2 >2.613ng/ml and Total NT-proBNP>632.65 pg/mL (positive when one of the biomarkers was above the cut-off). For the CRYPTO-AF cohort the panel optimizing accuracy included Ang-2 >1.26ng/ml and Total NT-proBNP>1221.4 pg/mL, and the one optimizing sensitivity included Ang-2 >1.26ng/ml and Total NT-proBNP>522.05 pg/mL, considered positive when the two markers were above the cut-off.

IDI and De Long test compared the performance of the clinical model with the biomarker panel, and the clinical model alone in each cohort.

AUC indicates area under the curve; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; OR, odds ratio; and ROC, receiver operator characteristics







**Association of blood-based biomarkers with cerebral lesions and cognitive decline in patients with atrial fibrillation**

(Under review)

---

# Association of blood-based biomarkers with silent brain infarcts in patients with atrial fibrillation

Elena Palà<sup>1</sup>, Irene Escudero-Martínez<sup>2</sup>, Anna Penalba<sup>1</sup>, Alejandro Bustamante<sup>1,3</sup>, Marcel Lamana<sup>1</sup>, Fernando Mancha<sup>2</sup>, Rafael F. Ocete<sup>4</sup>, Pilar Piñero<sup>4</sup>, Alejandro Galvao-Carmona<sup>5</sup>, Marta Gómez-Herranz<sup>6</sup>, Soledad Pérez-Sánchez<sup>2,7</sup>, Francisco Moniche<sup>8</sup>, Alejandro González<sup>4</sup>, Joan Montaner<sup>1,2</sup>.

1. Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR)-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.
2. Neurovascular Research Laboratory, Institute of Biomedicine of Seville-IBIS, Sevilla, Spain
3. Stroke Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain
4. Department of Radiology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain
5. Department of Psychology, Universidad Loyola Andalucía, Seville, Spain
6. NEURORHB, Servicio de Neurorehabilitación de Hospitales Vithas, Seville, Spain.
7. Stroke Unit, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, Spain
8. Stroke Unit, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

\*Corresponding author: Joan Montaner

Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain.  
joan.montaner@vhir.org, +34 93 489 4029.

---

**Background and Objectives:** Atrial fibrillation (AF) has been associated with an increased risk of silent brain infarcts (SBI), even in patients with low embolic risk. We aimed to test the usefulness of 11 promising blood-biomarkers representing different AF-related pathways to identify SBI in patients with AF and low embolic risk. **Methods:** The present study followed a cross-sectional design and included patients with available blood samples from a previously reported cohort study. 70 patients with a history of AF and a CHADS2 score  $\leq 1$ , and 10 controls with neither AF nor SBI were included. All patients underwent a 3T brain magnetic resonance imaging (MRI). Cortical and large subcortical ischemic lesions were considered presumed embolic origin lesions. **Results:** 45 patients presented SBI in the MRI, and 25 did not. Ang-2, FGF-23, and BMP-10 were increased in patients with SBI. BMP-10 was the only biomarker that predicted SBI (OR=4.98 [1.10-22.63],  $p=0.037$ ). Ang-2 was elevated only in patients with embolic infarcts, whereas FGF-23 and BMP-10 tended to be elevated in patients with both types of infarcts. **Conclusions:** BMP-10, FGF-23, and Ang-2 were increased in patients with SBI. Its usefulness should be further explored.

---

## 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia and its estimated prevalence increases with age. AF increases the risk of ischemic stroke 3- to 5-fold and is the cause of approximately 25–30% of all ischemic strokes [1–4]. AF has also been postulated as a cause of silent brain infarcts (SBI)[5,6], which are defined as cerebral infarcts observed on neuroimaging in the absence of any neurological symptoms referable to the corresponding area. Recent controlled studies have documented an increased risk of first stroke among those with SBI. For this reason, SBI should be considered as a risk factor and an initial manifestation of cerebrovascular disease, and not only as an incidental finding [7,8]. At present, the most commonly used tools to estimate the embolic risk in patients with AF are CHADS2 and CHA2DS2VASc scores [9]. However, a significant percentage of patients with AF and low embolic risk according to these scores present SBI if scanned

with a high field 3T magnetic resonance imaging (MRI), and might be considered of high risk [10].

Blood-based biomarkers might reflect the pathophysiological changes underlying AF and have been proposed as useful tools to identify AF and predict their progression and complications, such as stroke or peripheral embolisms, and have shown to improve the predictive ability of clinical risk scores such as the CHADS2 and CHA2DS2VASc scores [11]. The present study aims to test the usefulness of 11 promising blood-biomarkers representing different AF-related pathways to identify SBI in patients with AF and low embolic risk.

## 2. Methods

### 2.1. Study population

The present study followed a cross-sectional design and included patients with available blood samples from a previously reported cohort study [10]. Patients diagnosed with non-valvular AF between

February and May 2015, with CHADS2 score  $\leq 1$ , and age equal to or greater than 50 years from the Seville urban area were included. Patients were excluded when they had a medical history of previous stroke, transient ischemic attack (TIA), any other neurological disease, or cancer; if brain MRI was contraindicated due to pacemaker or other condition, or if they were taking oral anticoagulation (OAC) for stroke prevention. A 3T MRI was performed at inclusion. Healthy controls without AF or SBI matched by age and sex were included in the study.

The study protocol and consent forms were approved by the Ethics Committee of Virgen del Rocío University Hospital (reference no. 2014PI/162-1), and all participants gave written informed consent.

## 2.2. Neuroimaging protocol

All MRI scans were performed with the same Philips Ingenia 3.0T MRI scanner (Philips Healthcare, Best, Netherlands). MRI protocol included: sagittal three-dimensional T1-weighted gradient echo (1 mm slice thickness), sagittal three-dimensional T2-weighted fat-suppressed FLAIR (1 mm slice thickness), axial two-dimensional T2\*-weighted gradient echo (5 mm slice thickness), and axial two-dimensional diffusion-weighted imaging [DWI, (b0, b1000, ADC map), 3 mm slice thickness]. All scans were independently assessed twice by two of the four neuroradiologists enrolled in the investigation. The radiologists' experience in neuroradiology ranged from 4 to 16 years. Previous reports were blinded to avoid bias. If there was disagreement concerning a lesion, it was resolved by consensus between at least three of the neuroradiologists. Detection of SBI was the primary outcome of the study. The complete protocol has been previously described [10].

Briefly, SBI were first divided into acute/subacute lesions and chronic lesions according to signal presentation on DWI. We further subclassified every lesion according to the location and morphology into: cortical lesions (involving the cortex and adjacent subcortical gray matter), subcortical lesions (both lacune foci and larger lesions limited to subcortical white matter), basal ganglia lesions (both lacune foci and larger lesions involving deep gray nuclei), brainstem lesions, and cerebellar lesions. In cortical, subcortical, troncular, and cerebellar areas, any ischemic chronic lesion must show cavitation on FLAIR, but we accepted central hyperintensity on FLAIR imaging without

cavitation and low signal on T1-weighted images in deep gray matter lesions, as reported on the STRIVE neuroimaging reporting guidelines [12].

Cortical and large subcortical infarcts were considered of presumed embolic origin. We used a  $> 3$  mm threshold to consider any lesion as focal SBI. To differentiate them from focal enlarged perivascular spaces (PVS), we also analyzed the presence of complete surrounding FLAIR hyperintensities and their morphology.

## 2.3. Biomarker quantification

Blood was collected into EDTA tubes at the time of inclusion. After centrifugation at 1500 g and 4°C for 15 min, plasma aliquots were frozen at -80°C until biomarker determination. Biomarkers were centrally measured (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Growth differentiation factor 15 (GDF-15), Interleukin-6 (IL-6), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), and Troponin-T were measured with commercial in vitro diagnostic tests (Roche Diagnostics). Angiotensin-converting enzyme 2, bone morphogenetic protein 10 (BMP-10), dickkopf-related protein 3 precursor (DKK-3), endothelial cell specific molecule 1 (ESM-1), fibroblast growth factor 23 (FGF-23), insulin like growth factor binding protein 7 (IGFBP-7), and total NT-proBNP (including glycosylated and non-glycosylated forms) were quantified using a research grade prototype assay on a Cobas Elecsys e601 platform (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) employing Elecsys electrochemiluminescence technology.

## 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with SPSS version 21. Graphs were elaborated with GraphPad Prism 5. Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the data. Data were expressed as number (%) for categorical variables and as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range) for continuous variables, depending on the data distribution. For univariate analysis, the Mann-Whitney U-test or Student's t-test were used for continuous variables, and the  $\chi^2$  test was used for categorical variables. ANOVA or the Kruskal-Wallis test were used to compare  $>2$  variables depending on the variable distribution. The Spearman test was used for correlations.

The number of patients with available blood samples determined the sample size.

Samples below the limit of detection were substituted by the lowest value detected minus 0.5

for the analysis. Similarly, samples above the limit of detection were substituted by the highest value detected plus 0.5.

The predictive behaviour of individual biomarkers was tested using logistic regression models. Then, predictive biomarkers were entered in a multivariable logistic regression model adjusted by age and sex, and variables associated with SBI in our cohort.

### 3. Results

In total, 80 recruited patients with blood samples were included in the present study (10 controls and 70 AF patients). Regarding the AF classification, 50 patients had paroxysmal AF, 5 had persistent AF and 15 had permanent AF. Among AF patients, 45 were diagnosed with SBI and 25 did not. Table 1 shows the clinical characteristics of the included patients.

From the 11 proteins analyzed, 4 presented significant differences when comparing AF vs no AF individuals: GDF-15 (1310.50 pg/ml [903.67-1750.75] vs 930.60 pg/ml [590.07 vs 1051.00],  $p=0.005$ ), IGFBP-7 (98.63 ng/ml [88.00-109.80] vs 87.07 ng/ml [71.29-98.49],  $p=0.015$ ), NT-proBNP (218.25 pg/ml [76.82-525.5] vs 47.41), and Total NT-proBNP (1162.65 pg/ml [546.06-2198.72],  $p=0.001$ ). Also, Ang-2 (1.85 ng/ml [1.39-3.17] vs 1.39 ng/ml [1.19-1.93],  $p=0.067$ ), and Troponin-T (8.83 pg/ml [7.08-12.86] vs 7.10 [5.63-8.72],

$p=0.055$ ) tended to have increased levels in AF patients (Figure 1).

The concentration of some proteins varied depending on AF classification, usually with higher levels in permanent and persistent AF forms. Interestingly GDF-15, IGFBP-7, NT-proBNP, and Total NT-proBNP also showed higher levels in paroxysmal AF when compared to no AF in the present cohort (Supplemental Figure 1).

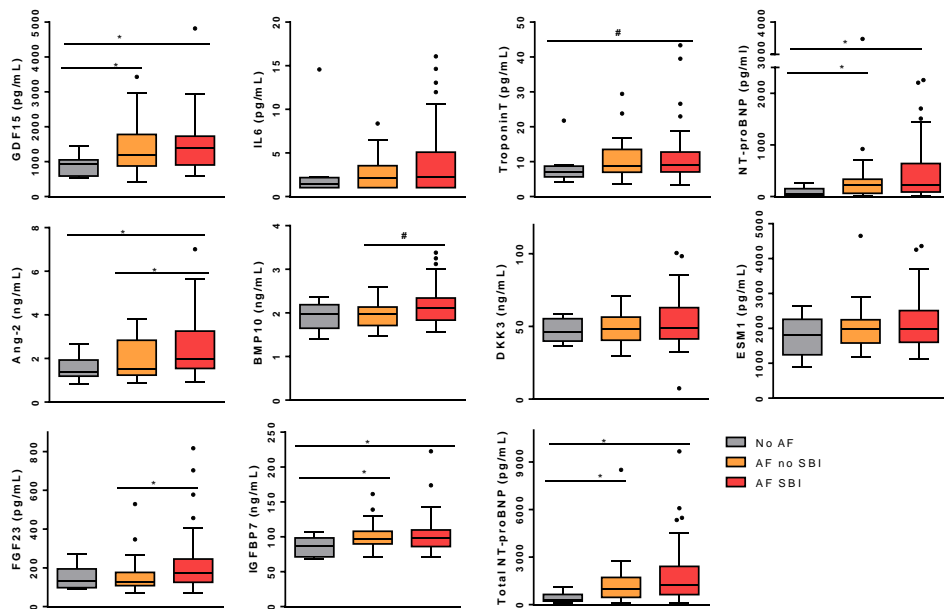
Regarding the diagnosis of SBI, Ang-2 (1.97 ng/ml [1.54-3.26] vs 1.49 ng/ml [1.23-2.84],  $p=0.041$ ), and FGF-23 (171.97 ng/ml [125.75-245.87] vs 126.22 ng/ml [108.63-176.66],  $p=0.032$ ) had significant increased level in comparison to patients without SBI, and BMP-10 showed a tendency (1.97 ng/ml [1.71-2.13] vs 2.10 ng/ml [1.83-2.34],  $p=0.051$ ). Also, several proteins showed increased level when comparing AF patients with SBI vs patients without AF (Figure 1). There were no differences in our cohort regarding the presence of SBI between different types of AF ( $p=0.719$ ).

BMP-10 was the only biomarker that predicted SBI (OR=4.98 [1.10-22.63],  $p=0.037$ ). When entered in a multivariable logistic regression model corrected by age and sex, BMP-10 was the variable showing the highest association, not reaching significance (OR=4.84 [0.99-23.67],  $p=0.051$ ). This model had an AUC of 0.645 [0.514-0.776],  $p=0.045$  (Supplemental Figure 2).

**Table 1: Clinical characteristics of the PARIAS cohort according to AF and SBI diagnosis**

	All (n=80)	No AF (n=10)	AF SBI (n=45)	AF no SBI (n=25)	P-value*	P-value#
Age	67.64±7.20	63.8±6.53	68.78±7.49	67.12±6.54	0.128	0.357
Sex (% female)	34 (43%)	4 (44.4%)	19 (42.2%)	11 (44%)	0.986	0.885
Tobacco					0.775	0.502
Non-smoker	66 (83.5%)	8 (88.9%)	36 (80%)	22 (88%)		
Smoker	11 (13.9%)	1 (11.1%)	8 (17.8%)	2 (8%)		
Ex-smoker	2 (2.5%)	0 (0%)	1 (2.2%)	1 (4%)		
Alcohol	23 (29.1%)	1 (11.1%)	16 (35.6%)	6 (24%)	0.268	0.318
Peripheral vascular disease	2 (2.5%)	0 (0%)	1 (2.2%)	1 (4%)	0.791	1.000
Hypertension	38 (48.1%)	3 (33.3%)	21 (46.7%)	14 (56%)	0.485	0.454
Diabetes	8 (10.1%)	1 (11.1%)	4 (8.9%)	3 (12%)	0.913	0.694
Dyslipidemia	32 (40.5%)	4 (44.4%)	21 (46.7%)	7 (28%)	0.303	0.127
Congestive Heart failure	1 (1.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0.335	0.357
Renal failure	1 (1.3%)	0 (0%)	1 (2.2%)	0 (0%)	0.682	1.000
Previous stroke	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1.000	1.000
Anticoagulation	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1.000	1.000
Antiplatelets	56 (73.7%)	0 (0%)	35 (77.8%)	21 (84%)	<0.001	0.533
AF type					0.719	0.719
Paroxysmal	50 (62.5%)	0 (0%)	32 (71.1%)	18 (72%)		
Persistent	5 (6.3%)	0 (0%)	4 (8.9%)	1 (4%)		
Permanent	15 (18.8%)	0 (0%)	9 (20%)	6 (24%)		

Comparison between the three groups: NoAF vs AF SBI vs AF no SBI #Comparison between AF SBI vs AF no SBI



**Figure 1: Boxplot distribution of the biomarker circulating levels in the PARIAS cohort.**

Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. The line in the middle is plotted as the median. Whiskers are drawn according to Tukey methodology ( $\pm 1.5$  IQR) and larger values are plotted as individual points. \*p-value<0.05. #p-value<0.1

Proteins increased in patients with SBI were further analysed according to the infarct profile. 24 patients had at least one SBI with an embolic profile, and 21 presented a non-embolic profile. Ang-2 was only significantly elevated in patients with embolic infarcts in comparison to no SBI patients. FGF-23 and BMP-10 tended to be elevated in patients with both types of infarcts. However, none of the biomarkers showed differences between embolic and non-embolic profiles (Figure 2).

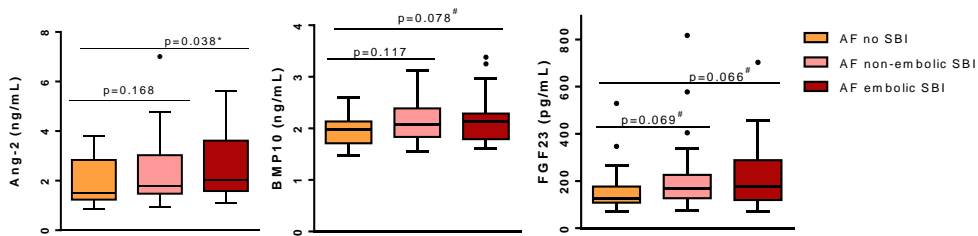
#### 4. Discussion

The present study showed interesting candidates related to subclinical brain infarcts in AF in a cohort of 70 AF patients with low embolic risk according to a clinical score (CHADS2  $\leq 1$ ). Specifically, BMP-10, FGF-23 and Ang-2 should be further explored.

Although it was not the main aim of the study, GDF-15, IGFBP-7 and NT-proBNP (total and glycosylated), were associated with AF. The lack of significant differences between AF and control patients for other biomarkers previously described

may be due to the reduced size of the control sample [11,13]. Interestingly, the biomarker profile of most of the proteins depended on the AF classification: NT-proBNP (non-glycosylated and total), Troponin-T, Ang-2, and BMP-10 showed significantly higher levels in permanent and/or persistent forms of AF.

In recent years, numerous studies have explored biomarkers associated with the risk of clinical cerebrovascular disease in AF patients. For example, the ABC stroke risk score proposed by Hijazi et al included NT-proBNP and Troponin-T to predict stroke in AF patients [14]. In contrast, although AF has been associated with the occurrence of SBI [6], few studies have explored biomarkers to detect them [15]. Identification of useful biomarkers in this regard would be of great interest, especially in populations with low embolic risk like the one presented here, in which anticoagulant treatment benefits are not as evident as in higher risk patients. It is known that a high proportion of patients considered as low risk by



**Figure 2: Boxplot distribution of Ang-2 and FGF-23 according to the type of SBI.**

Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. The line in the middle is plotted as the median. Whiskers are drawn according to Tukey methodology ( $\pm 1.5$  IQR) and larger values are plotted as individual points. \*p-value<0.05. #p-value<0.1

clinical scores would present SBI in MRI, with its increased risk of overt stroke, and may benefit from more aggressive prevention strategies [16]. However, MRI is an expensive tool that cannot be performed to all AF patients, and biomarkers could be used to identify a population subset to target high field MRI screening. In this sense, according to our results, Ang-2, FGF-23, and/or BMP-10, which showed higher levels in patients with SBI, could be promising biomarker candidates. Ang-2 is an endothelial growth factor involved in angiogenesis, inflammation, and endothelial dysfunction, which have been previously associated with incident and ongoing AF [13,17,18]. In our study, we confirmed the elevated levels of Ang-2 in AF patients, in comparison to controls. Also, we observed increased levels in patients with AF and SBI, especially in patients with embolic infarct type, indicating that this protein may be a marker of the thromboembolic risk of AF. In this sense, it has been previously suggested that Ang-2 may play a role in the AF prothrombotic state [19,20]. Also, a similar association between Ang-2 and SBI was described by Kriskai et al [15]. In their study, other biomarkers associated with SBI were also found, which we did not validate (e.g., NT-proBNP, GDF-15, Troponin-T...). The reason for obtaining different results may be that our cohort only included patients with CHADS2  $\leq 1$ . FGF-23 is a bone-derived hormone that regulates phosphate homeostasis and vitamin D metabolism. Although the mechanism by how FGF-23 and AF are related is not clear, this protein has been associated with incident and prevalent AF [21,22]. Similar to what we found, in the Northern Manhattan Study, a community-based stroke-free cohort, FGF-23 was associated with subclinical brain infarcts. What is more, in both studies FGF-23 was associated with WMH, indicating its role in SVD [23]. Finally, BMP-10 is a cardiac-specific protein involved in heart development [24]. BMP-10 has

been described to increase in AF patients and predict AF recurrence after ablation [25,26]. To our knowledge, the relation of this protein with brain lesions had never been explored. In our study it was the only protein able to predict SBI in an unadjusted logistic regression model, with a trend towards significance after adjusting for age and sex. Contrary of what we found by Ang-2, BMP-10 and FGF-23 tended to increase in both, embolic and non-embolic SBI, which may reflect other pathophysiological mechanisms beyond the thromboembolic capacity of AF.

The present study has several limitations. First, the limited sample size restricted the statistical power, and the present results should be validated in larger studies. Also, patients without AF and presence of SBI were not included in the present study and therefore, we cannot confirm if some of the results obtained are independent of the presence of AF.

**Conflicts of interest:**

Neurovascular research laboratory, Vall d’Hebron Institute of Research (VHIR) received institutional research support from Roche Diagnostics that funded part of the present study.

JM and AB have participated in scientific advisory boards organized by ROCHE on the topic of “New biomarkers in Atrial Fibrillation”.

**Funding:**

The Fundación Cajasol contributed to the study. Neurovascular Research Groups at Seville and Barcelona are part of the Spanish Neurovascular Disease Research Network (INVICTUS+, RD16/0019/0015).

**References**

1. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The framingham study. *Stroke*. 1991;22: 983–988. doi:10.1161/01.STR.22.8.983
2. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJV. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-Year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med*. 2002;113: 359–364. doi:10.1016/S0002-9343(02)01236-6
3. Marini C, De Santis F, Sacco S, et al. Contribution of atrial fibrillation to incidence and outcome of ischemic stroke: Results from a population-based study. *Stroke*. 2005;36: 1115–1119. doi:10.1161/01.STR.0000166053.83476.4a
4. Friberg L, Rosenqvist M, Lindgren A, Terént A, Norrving B, Asplund K. High prevalence of atrial fibrillation among patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45: 2599–2605. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006070
5. Vermeer SE, Longstreth WT, Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2007;6: 611–619. doi:10.1016/S1474-4422(07)70170-9
6. Kalantarian S, Ay H, Gollub RL, et al. Association between Atrial fibrillation and silent cerebral infarctions: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014;161: 650–658. doi:10.7326/M14-0538
7. Fanning JP, Wesley AJ, Wong AA, Fraser JF. Emerging spectra of silent brain infarction. *Stroke*. 2014;45: 3461–3471. doi:10.1161/STROKEAHA.114.005919
8. Gupta A, Giambone AE, Gialdini G, et al. Silent Brain Infarction and Risk of Future Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2016;47: 719–725. doi:10.1161/STROKEAHA.115.011889
9. Lip GYH, Nieuwlaar R, Pisters R, et al. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: The Euro Heart Survey on atrial fibrillation. *Chest*. 2010;137: 263–272. doi:10.1378/chest.09-1584
10. Escudero-Martínez I, Ocete RF, Mancha F, et al. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in patients with AF detected by 3T-MRI. *J Neurol*. 2020;267: 2675–2682. doi:10.1007/s00415-020-09887-0
11. Noubiap JJ, Sanders P, Nattel S, Lau DH. Biomarkers in Atrial Fibrillation: Pathogenesis and Clinical Implications. *Card Electrophysiol Clin*. 2021;13: 221–233. doi:10.1016/j.ccep.2020.10.006
12. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol*. 2013;12: 822–838. doi:10.1016/S1474-4422(13)70124-8
13. Staszewsky L, Meessen JMTA, Novelli D, et al. Total NT-proBNP, a novel biomarker related to recurrent atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021;21: 1–11. doi:10.1186/s12872-021-02358-y
14. Hijazi Z, Lindbäck J, Alexander JH, et al. The ABC (age, biomarkers, clinical history) stroke risk score: A biomarker-based risk score for predicting stroke in atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2016;37: 1582–1590. doi:10.1093/eurheartj/ehw054
15. Krisai P, Eken C, Aeschbacher S, et al. Biomarkers, Clinical Variables, and the CHA2DS2-VASc Score to Detect Silent Brain Infarcts in Atrial Fibrillation Patients. *J Stroke*. 2021;23: 449–452. doi:10.5853/jos.2021.02068
16. Smith EE, Saposnik G, Biessels GJ, et al. Prevention of Stroke in Patients with Silent Cerebrovascular Disease: A Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2017;48: e44–e71. doi:10.1161/STR.0000000000000116
17. Norby FL, Tang W, Pankow JS, et al. Proteomics and Risk of Atrial Fibrillation in Older Adults (From the Atherosclerosis Risk in Communities [ARIC] Study). *Am J Cardiol*. 2021;161: 42–50. doi:10.1016/j.amjcard.2021.08.064
18. Ko D, Benson MD, Ngo D, et al. Proteomics Profiling and Risk of New-Onset Atrial Fibrillation: Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc*. 2019;8. doi:10.1161/JAHA.118.010976
19. Choudhury A, Freestone B, Patel J, Lip GYH. Relationship of soluble CD40 ligand to vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and tissue factor in atrial fibrillation: A link among platelet activation, angiogenesis, and thrombosis? *Chest*. 2007;132: 1913–1919. doi:10.1378/chest.07-1565
20. Freestone B, Chong AY, Lim HS, Blann A, Lip GYH. Angiogenic factors in a trial fibrillation: A

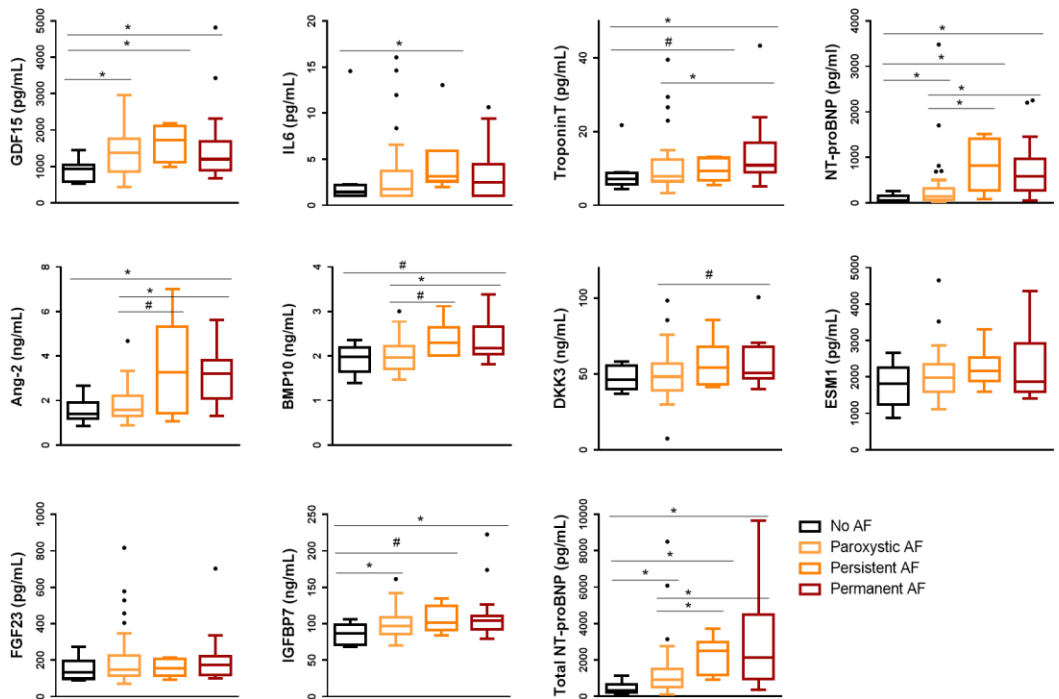


- possible role in thrombogenesis? *Ann Med.* 2005;37: 365–372. doi:10.1080/07853890510037392
21. Chua W, Law JP, Cardoso VR, et al. Quantification of fibroblast growth factor 23 and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide to identify patients with atrial fibrillation using a high-throughput platform: A validation study. *PLoS Med.* 2021;18: 1–17. doi:10.1371/JOURNAL.PMED.1003405
22. Mathew JS. Fibroblast Growth Factor-23 and Incident Atrial Fibrillation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and the Cardiovascular Health Study (CHS). *Circulation.* 2014;130: 298–307. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005499.
23. Wright CB, Shah NH, Mendez AJ, et al. Fibroblast Growth Factor 23 is Associated with Subclinical Cerebrovascular Damage: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Stroke.* 2016;47: 923–928. doi:10.1161/STROKEAHA.115.012379.
24. Neuhaus H, Rosen V, Thies RS. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF- $\beta$  superfamily. *Mech Dev.* 1999;80: 181–184. doi:10.1016/S0925-4773(98)00221-4
25. Reyat JS, Chua W, Cardoso VR, et al. Reduced left atrial cardiomyocyte PITX2 and elevated circulating BMP10 predict atrial fibrillation after ablation. *JCI Insight.* 2020;5: 1–16. doi:10.1172/jci.insight.139179
26. Staszewsky L, Meessen JMTA, Novelli D, et al. Total NT-proBNP, a novel biomarker related to recurrent atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021;21: 1–11. doi:10.1186/s12872-021-02358-y

# Association of blood-based biomarkers with silent brain infarcts in patients with atrial fibrillation

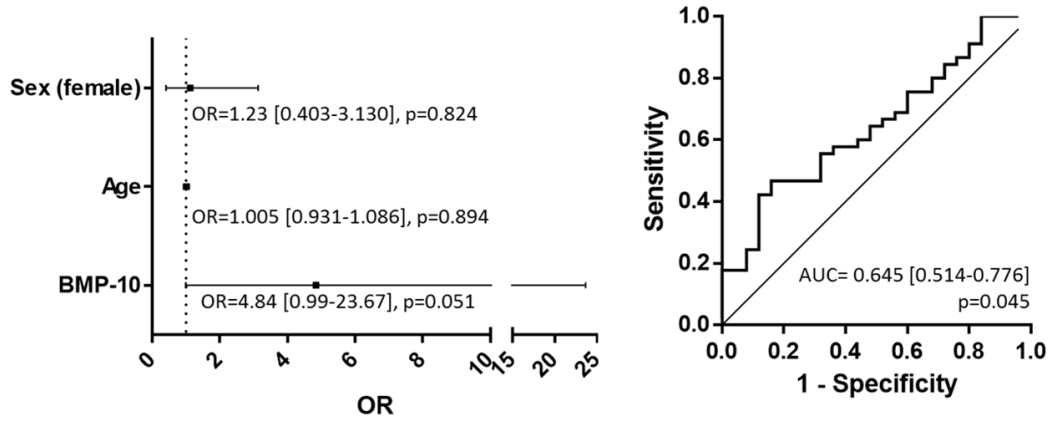
Elena Palà, Irene Escudero-Martínez, Anna Penalba, Alejandro Bustamante, Marcel Lamana, Fernando Mancha, Rafael F. Ocete, Pilar Piñero, Alejandro Galvao-Carmona, Marta Gómez-Herranz, Soledad Pérez-Sánchez, Francisco Moniche, Alejandro González, Joan Montaner.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL



**Supplemental Figure 1: Boxplot distribution of the biomarker circulating levels in the PARIAS cohort according to AF classification.**

Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. The line in the middle is plotted as the median. Whiskers are drawn according to Tukey methodology ( $\pm 1.5$  IQR) and larger values are plotted as individual points. \*p-value<0.05. #p-value<0.1



**Supplemental Figure 2: Multivariable logistic regression model to predict SBI in patients with AF.**

In the left panel, the odd ratio (OR), 95% confidence interval (CI) and P-value of each variable included in the model is indicated. In the right panel, the ROC curve of the model including BMP-10, age and sex is illustrated.



## 5.DISCUSSION



Malgrat saber que la FA és una de les principals causes de l'ictus i que la medicació anticoagulant en redueix el risc, la identificació d'aquesta patologia, i la correcta estratificació dels pacients que es podrien beneficiar d'aquests tractaments continua sent un repte. En aquest sentit, l'objectiu de la investigació continguda en la present tesi ha estat estudiar si l'ús de biomarcadors sanguinis podria ajudar a resoldre alguns d'aquests reptes, optimitzant així les estratègies de prevenció primària i secundària de l'ictus.

## 4.1. Reptes en el cribatge de fibril·lació auricular. La incorporació dels biomarcadors.

Tal com s'ha comentat al llarg de la tesi, la detecció de FA en fase asimptomàtica permetria iniciar tractaments preventius amb el potencial de reduir ictus i morts. Malgrat això, el principal repte en la implementació d'un cribatge de FA és la naturalesa paroxística de l'arrítmia. És a dir, tot i que la realització d'un ECG puntual permetria detectar alguns casos, l'absència d'un episodi de FA en un moment concret no descarta que instants abans o després el pacient n'hagi pogut patir un. La utilització de biomarcadors sanguinis s'ha proposat com a una eina útil en el cribatge de FA, ja que, a diferència de les tècniques electrocardiogràfiques, els biomarcadors podrien teòricament presentar algun tipus de "memòria biològica", mantenint-se elevats fora dels episodis de FA.

Per estudiar el paper dels biomarcadors en el cribatge de FA hem realitzat l'estudi AFRICAT, dividit en dues fases, en el que pacients entre 65 i 75 anys amb hipertensió i diabetis eren monitorats durant 30 dies amb un dispositiu Holter per detectar nous casos de FA. En l'**article 1** de la present tesi es van escollir biomarcadors prèviament descrits en la literatura i es van testar en la sang dels 100 pacients inclosos en la fase 1 de l'estudi, suggerint la utilitat de NT-proBNP en la detecció de FA, de forma similar a altres estudis previs.<sup>133-135</sup> En aquest estudi, NT-proBNP amb un punt de tall de 95 pg/ml presentava una alta sensibilitat, fins i tot per detectar FA paroxístiques (definides en l'estudi com aquells casos detectats únicament durant el monitoratge amb el dispositiu Holter).

En l'**article 2**, la mateixa cohort de pacients es va utilitzar per identificar nous biomarcadors de detecció de FA que poguessin complementar NT-proBNP. Es va seguir un disseny similar al presentat en l'apartat 1.3.2 de la introducció, integrant fases de descobriment, verificació i validació. Així, els millors candidats de les fases de descobriment i verificació, es van intentar validar, juntament amb NT-proBNP, en els 259 pacients inclosos en la fase 2 de l'estudi AFRICAT.

Com a resultat, en aquest article vam validar NT-proBNP com a biomarcador de detecció de FA, però la seva utilitat a l'hora d'identificar casos de FA paroxística va resultar ser limitat al tenir en compte la cohort completa. De fet, tot i que la sensibilitat obtinguda amb els punts de tall proposats en **l'article 1** es va mantenir, quan s'analitzava tota la cohort, en **l'article 2**, l'especificitat va disminuir. Per altra banda, cap dels biomarcadors provinents de l'estudi de descobriment no van ser capaços de millorar el rendiment de NT-proBNP.

La principal diferència entre les dues fases de l'estudi va ser la inclusió de pacients amb història prèvia de FA en la fase 1 per tal d'incrementar la potència estadística en el descobriment de biomarcadors. En canvi, en la fase 2, aquest es va considerar un criteri d'exclusió, i, per tant, la prevalença de FA va disminuir. La impossibilitat de validar alguns resultats de la fase prèvia pot ser degut al fet que la majoria de FAs en la fase de validació eren paroxístiques i aquestes eren difícils de detectar per part dels biomarcadors testats. A més, el percentatge de pacients en el grup control era major, capturant millor la variabilitat de la població.

Per tal de complementar els dos articles previs i seguint en la recerca de biomarcadors que siguin útils en el context de l'atenció primària, en **l'article 5** es va avaluar en la cohort AFRICAT el potencial ús clínic de panells incloent proteïnes representatives de diverses vies relacionades amb la FA. Com a resultat, es va descriure la combinació de NT-proBNP i Ang-2 com a candidats a utilitzar en el cribatge de FA en pacients asimptomàtics d'alt risc.

Respecte NT-proBNP, en l'estudi poblacional STROKESTOP II s'avalua l'ús aquest biomarcador amb un punt de tall de 125 pg/ml com a eina per estratificar els pacients en el context d'un cribatge sistemàtic, i oferir un cribatge extens només a aquells d'alt risc.<sup>136</sup> Els resultats de l'anàlisi preliminar d'aquest estudi indiquen que seguint aquesta estratègia es detecta un percentatge similar de FAs al que s'obté quan els pacients no es seleccionen i tots realitzen ECGs puntuals durant dues setmanes (estratègia seguida per l'estudi STROKESTOP I).<sup>134</sup> El seguiment de 5 anys d'aquest estudi ens proporcionarà més informació sobre si aquesta estratègia redueix el risc d'ictus.

Cal destacar que, a la pràctica clínica, els casos més interessants a identificar amb biomarcadors són les FA paroxístiques, ja que són aquells pacients difícils de ser detectats amb altres metodologies. En els **articles 2 i 5** es mostra que els valors circulants d'algunes proteïnes augmenten en pacients amb una càrrega de FA alta, però que trobar un biomarcador capaç d'identificar FA asimptomàtica amb poca càrrega és més difícil. No obstant, els resultats de

l'estudi LOOP fan reflexionar sobre si un cribatge dirigit a la cerca d'episodis curts de FA subclínica val la pena, ja que el benefici de la teràpia anticoagulant en aquests casos no és clara.<sup>77</sup>

Fins al moment, no s'ha intentat implementar cap estratègia de cribatge a Catalunya, a part d'algunes accions promovent la detecció de FA com pot ser la campanya de Pren-te el pols.<sup>79</sup> Més enllà de l'anàlisi de biomarcadors, en l'**article 2** s'explica com l'estudi AFRICAT ha permès explorar la logística d'un cribatge sistemàtic en tres territoris catalans obtenint molts aprenentatges que podran ser útils en el futur disseny d'altres estudis. Per exemple, el monitoratge amb un dispositiu Holter ha permès identificar durant la primera setmana el 80% de casos de FA que es detectarien en el seguiment d'un mes. Aquesta dada és important perquè tot i que altres estudis han demostrat que el percentatge de detecció de FA augmenta amb la duració, la dispersió i la freqüència del monitoratge,<sup>73</sup> en el context d'un programa de cribatge calen seguiments més curts que permetin optimitzar el cost-benefici, i disminuir el desconfort dels pacients. També, en l'**article 2** s'ha testat i discutit l'ús de 4 dispositius ràpids de detecció de FA. A diferència d'un ECG, aquests dispositius són ràpids d'utilitzar i tenen algorismes d'interpretació incorporats, fet que en simplifica l'ús per part de personal sense formació específica en interpretació de ECG. En el nostre estudi, MyDiagnostick i Watch BP varen ser els dispositius amb més bons resultats a nivell d'especificitat i sensibilitat per detectar FA en una sola visita en comparació a un ECG. De tota manera, el ventall de dispositius disponibles actualment és molt gran i a l'hora de seleccionar el més adequat cal tenir en compte, a part de la seva fiabilitat, les seves particularitats, així com el context en el qual s'usarà.<sup>72</sup> El dispositiu més adequat no serà el mateix per un estudi de cribatge sistemàtic seqüencial que per un cribatge oportunista, o si la utilització serà per part del mateix pacient al seu domicili davant la presència de simptomatologia.

Tenint en compte els nostres resultats, es podria dissenyar un programa de cribatge similar al proposat en la Figura 9 per la nostra població, el cost-benefici del qual s'hauria d'analitzar.



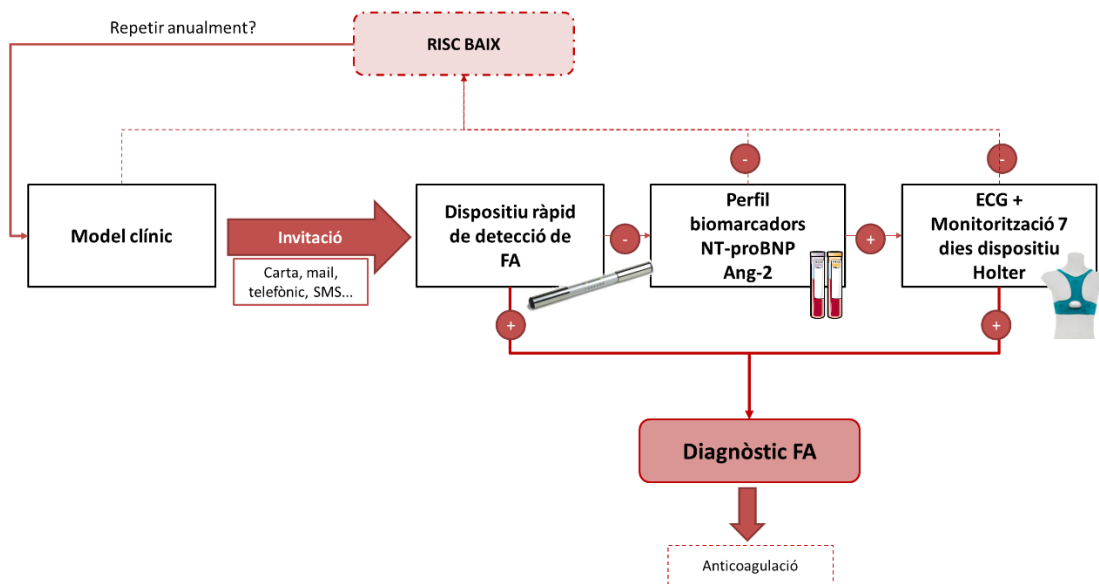


Figura 9: Proposta de cribratge sistemàtic

## 4.2. L'ús de biomarcadors per identificar FA després d'un ictus.

Després d'un ictus sense causa aparent encara resulta més òbvia la necessitat de buscar una possible FA per tal d'iniciar una prevenció secundària òptima com més aviat millor i evitar recurrències. En la pràctica clínica la majoria de centres monitoren els pacients durant 24 o 72 hores seguint les recomanacions de la ESC,<sup>37</sup> però tot i això calen eines per identificar quins pacients es beneficiarien de monitoratges més llargs de forma immediata, i en aquest punt els biomarcadors poden jugar un paper important.

En l'article 3 s'ha explorat la utilitat dels pèptids natriurètics en la predicció de FA paroxística durant el primer mes després d'un ictus criptogènic. Tant BNP com NT-proBNP tenen un mateix precursor i se secreten en concentracions equimolars en resposta a l'estrès sobre les parets del múscul cardíac. Tot i així, les diferències en la vida mitjana i els mecanismes d'eliminació d'aquestes molècules poden comportar diferències en el seu comportament com a biomarcadors. Segons els nostres resultats, els dos biomarcadors són bons predictors de FA però BNP seria millor en termes d'especificitat. Tot i que és difícil explicar aquests resultats, podem pensar en algunes hipòtesis. Per exemple, la concentració de NT-proBNP, com a conseqüència d'una vida mitjana més llarga de la molècula, es podria veure més influenciada per altres

condicions, tant cardíques com no cardíques, i fins i tot per l'ictus en si mateix. Per altra banda, degut a la seva ràpida eliminació, nivells alts en circulació de BNP poden ser el reflex d'una secreció continua per part dels cardiomiòcits, conseqüència de la disfunció auricular que es produeix en la FA. Tot i així, aquests resultats s'han d'interpretar amb cautela tenint en compte que la diferència entre els dos marcadors no és molt notòria i que els resultats s'han obtingut en una cohort limitada. No obstant, a nivell pràctic, aquests resultats es traduirien en el fet que els dos pèptids són bons candidats per utilitzar a l'hora de descartar els pacients que amb poca probabilitat presentaran FA i que no caldria monitorar. En canvi, en situacions en les quals cal un biomarcador amb alta especificitat, per exemple, per prioritzar quins pacients es beneficiarien d'un monitoratge prolongat immediatament després de l'ictus, o fins i tot, seleccionar pacients candidats a anticoagulació, BNP seria un millor candidat. De totes maneres, al ser dos marcadors similars, molts centres utilitzen de forma rutinària un o altre, i la possible translació clínica en cada hospital estarà influenciada per la tecnologia implementada en les seves instal·lacions. A més, en relació amb la selecció de pacients que es beneficiarien d'anticoagulants, s'estan realitzant els assaigs clínics ARCADIA <sup>114</sup> i MOSES <sup>115</sup> que estan testant l'ús de pèptids natriurètics concrets (NT-proBNP i MR-proANP) per aquesta indicació. Si aquests assajos mostren resultats positius segurament l'ús d'aquests biomarcadors seran els que més s'estendran en la pràctica clínica.

Tot i el potencial dels pèptids natriurètics per predir FA en ictus criptogènics, la capacitat predictiva no és perfecte i continua existint la necessitat d'identificar nous biomarcadors per complementar-ne el seu ús. Amb aquest objectiu, en l'**article 4** s'ha dut a terme un experiment de descobriment utilitzant la tecnologia dels aptàmers que ha permès analitzar més de 1310 proteïnes simultàniament. Tot i que en aquesta fase de descobriment, vam identificar varis possibles biomarcadors candidats amb p-valors similars a les proteïnes ja validades BNP i NT-proBNP, al intentar validar-los en una cohort més extensa, la majoria van resultar ser falsos positius. De fet, l'únic biomarcador validat va ser DPP7 que mostrava valors més baixos en els pacients amb FA. Això, juntament amb el fet que altres membres de la seva família s'hagin relacionat amb l'aterosclerosi,<sup>137</sup> sembla indicar que aquest marcador podria estar relacionat amb una possible etiologia arterioscleròtica en els pacients criptogènics sense FA. Una altra hipòtesi seria que DPP7 tingues un rol en la fisiopatologia de la FA disminuint-ne el risc. De totes maneres, existeix poca informació respecte a aquesta proteïna i en cas de confirmar els nostres resultats seria interessant explorar-ne el seu mecanisme d'acció. A part, caldria continuar

explorant el seu potencial com a biomarcador així com la seva utilització conjunta amb altres biomarcadors com els pèptids natriurètics.

Per altra banda, en **l'article 5** es va avaluar el potencial ús clínic de panells de proteïnes representatives de vies relacionades amb la FA en la mateixa cohort de pacients amb ictus criptogènics. De forma similar al que es va descriure per pacients asimptomàtics, la combinació de Ang-2 juntament amb BNP (o altres pèptids natriurètics), presentà una capacitat predictiva força bona, sense arribar a ser òptima.

Cal comentar que en aquesta tesi ens hem centrat en la cerca de FA després d'un ictus criptogènic/ESUS, ja que la FA paroxística s'ha descrit com una de les causes freqüents no identificades darrere aquest tipus d'ictus.<sup>81</sup> De tota manera, la cerca de FA podria ser també beneficiosa en pacients amb ictus d'etiologia identificada, que també presenten un alt percentatge de FA després de monitoratges llargs.<sup>138</sup> Al final, un cop s'identifica la FA en un pacient, si aquesta era la causa del ictus índex és irrellevant perquè la malaltia en si mateixa comporta un risc, i la causa d'un ictus recurrent pot variar del ictus inicial.<sup>139</sup> Aquesta és una de les limitacions de molts dels sistemes de classificació de l'etiologia de l'ictus com el TOAST, en el que en descriure una causa probable de l'ictus ja no s'exploren la resta de causes que poden coexistir en un mateix pacient i contribuir en el risc futur de recurrència. Idealment, aquestes s'haurien d'adreçar de forma individualitzada seguint un esquema de medicina personalitzada.

### 4.3. Les dificultats en els estudis de descobriment de nous biomarcadors de FA. El paper de la cardiomiopatia atrial.

Tal com s'ha explicat fins al moment, en **els articles 2 i 4** d'aquesta tesi s'han realitzat estudis de descobriment de nous biomarcadors candidats de FA. El disseny experimental cas-control dels dos estudis va ser similar, però la diferència és que la població estudiada no era la mateixa: en **l'article 2** s'inclouïen pacients asimptomàtics, i en **l'article 4** pacients amb ictus criptogènics.

Cal destacar que en els dos estudis es va utilitzar la tecnologia SOMAscan basada en els aptàmers de DNA, una tècnica que competeix directament amb altres plataformes proteòmiques com poden ser els panells d'anticossos o la tecnologia PEA de la companyia Olink.<sup>118</sup> Els aptàmers utilitzats en la plataforma SOMAscan reben el nom de SOMAmers, i són oligonucleòtids de cadena simple modificats amb residus hidrofòbics, que els confereixen una estructura tridimensional amb afinitat per unir-se de forma selectiva a proteïnes diana. Aquesta tècnica ens

ha permès mesurar milers de proteïnes en una mateixa mostra, cobrint un ampli rang dinàmic, i superant així algunes de les limitacions amb les quals s'enfronten els immunoassaigs multiplexats o l'espectrometria de masses.<sup>119</sup>

En tots dos estudis, però, s'han obtingut escassos resultats i la validació dels candidats en fases posteriors ha revelat un gran nombre de falsos positius. La falta de validació dels estudis de descobriment no és res nou, i és també un dels principals desafiaments en la cerca de nous biomarcadors en altres malalties.<sup>116</sup> Una de les principals raons rere la falta de validació i reproductibilitat entre els experiments de descobriment de biomarcadors és la limitada mida mostral, problema intrínsec d'aquest tipus d'estudis en què les metodologies continuen tenint un alt cost. Per tal d'identificar biomarcadors interessants amb un nombre limitat de mostres s'utilitzen grups emparellats que difereixen únicament en la condició d'interès. Llavors, a l'augmentar el nombre d'individus per grup en fases posteriors i capturar millor la variabilitat de la població, molts d'aquests candidats, que no són específics per la malaltia en qüestió, deixen de ser bons biomarcadors. A més, no podem descartar que la falta de validació en els nostres estudis sigui degut a la disparitat de resultats entre les tècniques emprades en el descobriment i la validació. Tot i no ser un fenomen generalitzat, s'ha descrit que algunes proteïnes presenten correlacions baixes entre els resultats obtinguts amb tècniques basades en els aptàmers i els immunoassaigs convencionals, i fins i tot entre diferents tipus d'immunoassaigs.<sup>140,141</sup> La reactivitat creuada, la interacció amb diferents epítops, i la cooperativitat negativa són algunes de les explicacions rere la falta de concordança entre mètodes per algunes proteïnes en concret.

A part de les problemàtiques inherents en la identificació i desenvolupament de nous biomarcadors, en el cas de la FA s'afegeixen altres dificultats a causa de la complexitat de la malaltia. Com s'explica a continuació, tractar la FA com una entitat binària (presència o absència) és una visió simplista. En primer lloc, se sap que com més llargs fossin els monitoratges, més pacients amb FA detectaríem.<sup>73</sup> Per tant, tot i que amb un monitoratge d'un mes, com el que hem realitzat en els nostres estudis, aconseguim detectar una gran quantitat de casos, no podem descartar que els casos classificats com a no FA puguin patir un episodi el dia després que finalitzem el seu seguiment, fet que els faria canviar de grup. En segon lloc, la càrrega de FA també pot jugar un paper important. Pel que hem vist en els estudis presentats en aquesta tesi, diversos biomarcadors s'elevan en individus amb molta càrrega de FA, però és difícil trobar biomarcadors que identifiquin FAs paroxístiques, fet que ens fa qüestionar quin tipus de casos hauríem d'incloure en els estudis de descobriment. A l'incloure només FAs establertes

segurament ens seria més fàcil identificar biomarcadors elevats, però ens podriem trobar que aquests fossin difícils de validar en una població d'individus amb FA paroxística tal com ens ha passat en **l'article 2**. En aquest cas vam incloure pacients amb FA permanent en la primera fase de l'estudi per tal d'augmentar el poder estadístic però quan es van testar alguns d'aquests biomarcadors candidats (ST-2<sup>142</sup> i TIMP-2<sup>143,144</sup>) en la segona fase de l'estudi, en la que només incloïem FA paroxístiques, els resultats no es van poder validar.

Per últim, cada cop pren més força la teoria que la FA no només és un factor de risc, sinó un indicador més de la cardiomiopatia auricular subjacent que per si sola pot augmentar la susceptibilitat a l'ictus. Aquesta teoria permet explicar algunes paradoxes de la relació entre la FA i l'ictus, com per exemple la dissociació temporal entre els episodis de FA i l'aparició d'ictus,<sup>55,145</sup> o el fet que les estratègies de control del ritme no en disminueixin significativament el risc.<sup>146</sup> A més, varis marcadors de disfunció auricular s'han associat al risc d'ictus, independentment de la presència de FA.<sup>147</sup> En conseqüència, s'hauria de treballar en buscar biomarcadors sanguinis capaços d'identificar, no només la FA, sinó també el substrat patològic subjacent.

En aquest sentit, i aprofitant que els pacients de **l'article 4** estaven molt ben fenotipats, es va realitzar un estudi explorant proteïnes circulants que podrien estar associades a la cardiomiopatia atrial. En aquest estudi, es van utilitzar els paràmetres ecocardiogràfics LAVI (de l'anglès *left atrial volum index*), i PALS o *strain* (de l'anglès *peak atrial longitudinal strain*), explorant la seva correlació amb proteïnes circulants. Un valor elevat de LAVI ens indica una aurícula dilatada, mentre que un valor baix de PALS s'interpreta com una aurícula amb poca contractilitat. Els dos paràmetres estan íntimament relacionats i es poden emprar per caracteritzar la cardiomiopatia atrial.<sup>148</sup> Com a resultat, en aquest article descrivim algunes proteïnes circulants que s'associen amb la cardiomiopatia atrial. De forma interessant, NT-proBNP és una proteïna que s'eleva en la FA i també en la cardiomiopatia atrial, mesurada tant pel LAVI com pel PALS. Però a part d'aquesta proteïna, en el nostre estudi no obtenim cap més resultat en comú, i curiosament, moltes més proteïnes es veuen alterades en pacients amb PALS baix, en comparació a LAVI alt. Això pot indicar que la remodelació que provoca un deteriorament de la contractilitat auricular altera un nombre més gran de proteïnes que aquells canvis que provoquen un augment del volum de l'aurícula. En estudis previs s'ha vist que les mesures del *strain* auricular són més sensibles que les mesures volumètriques per predir la FA, i que la disfunció de l'aurícula esquerra pot precedir i/o ser independent a canvis anatòmics com

la seva dilatació.<sup>149</sup> De totes maneres, a l'hora d'interpretar aquests resultats cal tenir presents les limitacions del nostre estudi, entre les quals destaquen la reduïda mida mostral i el fet que l'experiment no fos dissenyat inicialment per fer aquest tipus d'anàlisi sinó per comparar pacients amb presència o absència de FA. Per tant, tal com ja es comenta en **l'article 4**, aquest estudi s'ha de considerar generador d'hipòtesis.

Més enllà d'identificar biomarcadors, les tècniques -òmiques ens permeten fer anàlisis de vies i tenir així una visió més amplia de la fisiopatologia d'una malaltia. Amb l'objectiu de revelar vies que podien tenir un paper en la FA i la cardiomiopatia auricular, en **l'article 4**, es va realitzar un anàlisi bioinformàtic seguint un *pipeline* publicat.<sup>132</sup> Com a resultat, descrivim vies relacionades amb la senyalització dels limfòcits i les quimiocines, regulades a l'alça en pacients amb FA, i corroborem la importància prèviament descrita de la resposta inflamatòria en la FA.<sup>150</sup> Altres exemples de vies que trobem sobreexpressades són la senyalització dels factors de creixement, que també es pot relacionar amb la resposta inflamatòria, o amb la fibrosi que es produeix al cor,<sup>151</sup> i el transport de calci, que és essencial per al correcte funcionament elèctric del cor.<sup>38</sup> Pel que fa a la cardiomiopatia auricular, l'anàlisi bioinformàtic va revelar moltes vies desregulades en pacients amb funció auricular alterada, que es podrien classificar principalment en processos de transducció de senyals, metabolisme, resposta immune i hemostàsia.

Cal comentar, que en altres estudis s'han explorat altres tipus de mostres biològiques com el teixit atrial.<sup>152</sup> Aquests estudis ens poden donar informació sobre la patogènia de la FA però no és viable l'obtenció invasiva d'aquest tipus de mostres a gran escala, especialment en en pacients sense patologia. La sang, en canvi, és una mostra fàcilment accessible i a la vegada, tot i la seva complexitat i heterogeneïtat, és un reflex de les alteracions moleculars que que succeeixen en altres parts del cos.

#### 4.4. Comparació del potencial ús clínic de biomarcadors candidats en diferents etapes de la FA

En els **articles 5 i 6** hem testat un panell representatiu de 10 proteïnes que s'han relacionat, en menor o major mesura, amb la FA. Aquest es va analitzar en tres cohorts, les quals exemplifiquen diferents situacions/etapes de la malaltia en les que els biomarcadors podrien ser útils, algunes de les quals ja hem descrit: pacients asimptomàtics amb alt risc de FA, pacients després d'un ictus criptogènic, i pacients amb FA diagnosticada considerats de baix risc embòlic. L'objectiu era

proporcionar una visió global del paper que juguen aquestes proteïnes en la malaltia i el seu potencial ús clínic.

Les proteïnes escollides englobaven marcadors inflamatoris (IL-6 i GDF-15), de disfunció endotelial (Ang-2, ESM-1), d'estrès/dany cardíac (NT-proBNP, Troponina-T, BMP-10, DKK-3, IGFBP-7), o de fibrosis (FGF-23), totes vies relacionades amb la FA. Algunes proteïnes, com NT-proBNP o Troponina-T, eren biomarcadors àmpliament estudiats i s'havien associat amb l'ocurrència, la recurrència, o el pronòstic de la FA.<sup>90</sup> Altres, tot i que menys explorats en la literatura, podien ser candidats interessants segons els resultats d'alguns estudis puntuals.<sup>153-160</sup> A més, tots els biomarcadors es van mesurar amb immunoassaigs automatitzats, fet que en facilitaria la translació clínic en un futur.

En l'**article 5**, ens vam focalitzar en explorar el rol d'aquestes proteïnes en la detecció de FA, en pacients asimptomàtics i en pacients que haguessin patit un ictus. Com hem comentat en els apartats anteriors, la detecció de FA en aquestes situacions permetria que els pacients es beneficiessin de medicació anticoagulant per prevenir futurs ictus. En canvi, en l'**article 6**, en el que s'inclouen pacients amb FA ja diagnosticada considerada de baix risc embòlic, vam estudiar el paper d'aquestes proteïnes en la detecció de lesions cerebrals silents. La identificació d'aquestes lesions augmentaria el risc embòlic dels pacients en qüestió, fent-los així també possibles beneficiaris de tractaments anticoagulants.

Part dels resultats de l'**article 5** s'han discutit en apartats anteriors. Tanmateix, cal destacar, que una de les fortalezes d'haver mesurat el mateix panell de proteïnes és la possibilitat de comparar els resultats obtinguts entre cohorts. Després d'un ictus es produeix una resposta local i sistèmica que provoca molts canvis pel que fa a proteïnes circulants.<sup>161,162</sup> Per tant, el comportament d'alguns biomarcadors en la detecció de FA pot no ser el mateix en pacients asimptomàtics que després d'un ictus, a causa de la influència de l'ictus en si mateix. Per exemple, s'ha descrit l'augment d'algunes de les proteïnes testades com IL-6,<sup>163</sup> NT-proBNP,<sup>164</sup> o ESM-1<sup>163</sup> després de un ictus, de forma similar al que nosaltres observem. També, les diferències basals de les cohorts poden influir. Per exemple, tots els pacients de la cohort AFRICAT tenien hipertensió i diabetis com a comorbiditats, mentre que el percentatge d'aquestes patologies era menor en el cas de la cohort CRYPTO-FA. La influència d'aquestes patologies en alguns biomarcadors com és el cas de GDF-15, FGF-23, i IGFBP-7 pot explicar que aquests estiguin més elevats en la cohort AFRICAT.<sup>165-167</sup> Finalment, una altre explicació podria

ser que els pacients amb FA detectada després d'un ictus tinguessin un pitjor substrat patològic, amb una major afectació en l'expressió de certes proteïnes. Aquesta hipòtesi podria explicar les concentracions més altes que trobem d'algunes proteïnes (ex. DKK-3), en els casos de FA detectada després d'un ictus en comparació als individus amb FA asimptomàtica. Tot i les diferències entre les dues cohorts, Ang-2, NT-proBNP, i Troponin-T presentaven nivells més alts en els pacients amb FA de les dues. Confirmant els nostres resultats, en la cohort PARIAS de **l'article 6** aquests tres biomarcadors també tenien concentracions més elevades en pacients amb FA, tot i que en el cas de Ang-2 i Troponin-T aquesta diferència no arribava a ser significativa i es quedava en una tendència. Això pot ser degut a la reduïda mostra del grup control sense FA inclosa en aquest estudi, ja que la cerca de biomarcadors de detecció de FA no n'era l'objectiu principal. Cal tenir en compte també que la cohort PARIAS té moltes menys comorbiditats que la resta de cohorts ja que els criteris d'inclusió d'aquest estudi eren pacients amb CHADS<sub>2</sub>≤1.

De tots els marcadors estudiats, Ang-2 i NT-proBNP destaquen com els candidats més interessants per detectar FA, ja que es comporten com a predictors independents en les dues cohorts de **l'article 5**. Les dues proteïnes representen vies diferents afectades per la FA. Per una banda, Ang-2 és un marcador de disfunció endotelial. Aquesta proteïna s'ha associat amb el risc de FA incident, i nivells elevats s'han descrit en pacients amb FA crònica en comparació a pacients en ritme sinusal.<sup>155,156,159</sup> De fet, s'ha hipotetitzat el rol d'aquesta proteïna en l'estat protrombòtic de la FA.<sup>148,149</sup> En relació amb aquest punt, cal destacar que en **l'article 6** observem que Ang-2 està més elevada en els pacients que tenen infarts silencis, en concret en aquells de tipus embòlic, donant força a aquesta hipòtesi. Per altra banda, NT-proBNP s'allibera per part dels cardiomiòcits en resposta a una sobrecàrrega de pressió o volum en el múscul cardíac.<sup>105</sup> Tot i que l'addició d'Ang-2 no millora l'AUC de NT-proBNP, aquesta proteïna sí que té un valor predictiu addicional segons l'índex IDI. A més, en aquest estudi, el software PanelomiX ha inclòs ambdues proteïnes en un panell diagnòstic que ha calculat diferents punts de tall depenent de la cohort. Cal puntualitzar que l'algoritme del PanelomiX és molt influenciable a observacions individuals, especialment si en la mostra hi ha *outliers*, i, per tant, cal interpretar els punts de tall seleccionats com una referència per futurs estudis de replicació. En resum, tot i que les dues proteïnes representen vies diferents i els nostres resultats indiquen una possible complementaritat com a biomarcadors, aquesta s'hauria d'explorar en altres estudis.

Per la detecció de FA, en aquesta tesi hem estudiat diferents formes del pèptid natriurètic tipus B: BNP, NT-proBNP, i total NT-proBNP (el qual detecta formes glicosilades i no glicosilades). Les



tres molècules correlacionen i tenen rendiments similars. De fet, un cop es combinen amb Ang-2 i variables clíniques bàsiques, obtenim resultats similars pels tres pèptids, només amb una lleugera millora en el cas de BNP pel que fa als pacients després d'un ictus, en línia amb el que obteníem en **l'article 2**. En pacients asimptomàtics, BNP no s'ha mesurat, i, per tant no podem saber quin seria el seu comportament.

Un cop la FA es detecta, cal avaluar-ne el potencial embòlic i determinar si el pacient en qüestió es podria beneficiar d'anticoagulants orals. En els últims anys s'han explorat l'ús dels biomarcadors sanguinis a l'hora d'avaluar el risc dels pacients amb FA, i un exemple d'això són les escales ABC proposades per Hijazi et al.<sup>112,168</sup> De moment, però, tal com s'ha comentat en la secció 1.2.1 de la introducció, aquesta decisió és du a terme amb l'ajuda d'escales clíniques d'estratificació del risc com el CHADS<sub>2</sub> o el CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc. Així i tot se sap que un alt percentatge de pacients considerats de baix risc segons aquestes escales presentarien infarts silencis si se'ls realitza una ressonància magnètica d'alt camp.<sup>63</sup> En aquest cas, el risc teòric augmentaria i aquests pacients es podrien beneficiar d'anticoagulants. En **l'estudi 6**, descrivim que Ang-2, FGF-23 i BMP-10 estan més elevats en pacients amb infarts silencis, i, per tant podrien ser biomarcadors candidats per identificar quins pacients necessitarien una RM a l'hora d'avaluar el tractament de prevenció de l'ictus més adequat. FGF-23 i Ang-2 s'han relacionat amb infarts cerebrals subclínic en altres estudis<sup>169,170</sup>, mentre que és la primera vegada que, al nostre coneixement, s'explora aquesta relació en el cas de BMP-10. Tot i així, el potencial d'aquestes proteïnes com a biomarcadors no està clar ja que només BMP-10 és predictor en un model de regressió logística, però deixa de ser-ho al ajustar per sexe i edat. A més, no podem saber la raó per la qual aquestes proteïnes s'elevan, és a dir, si tenen un rol en el potencial tromboembòlic de la FA o, si, per contra en són una conseqüència i és la presència de lesions silencis que en produeix un augment.

## 4.5. Perspectives de futur

En els pròxims anys, en el context de la detecció i maneig de la FA, els biomarcadors podrien servir per prendre decisions clíniques com si un pacient té alt risc de patir FA i cal monitoritzar-lo més prolongadament, si cal realitzar-li una RM per avaluar el seu risc embòlic, o fins i tot si cal anticoagular-lo. De tota manera, encara no estem en aquest punt i primer cal identificar quins són els biomarcadors més adequats per cada una d'aquestes indicacions. Al llarg d'aquesta tesi hem avaluat l'ús de biomarcadors ja descrits en la bibliografia en indicacions clíniques concretes,

alhora que realitzàvem estudis de descobriment de nous biomarcadors que poguessin complementar als que ja existien.

En prevenció primària, aquesta tesi ha fet palesa la dificultat per trobar biomarcadors que siguin capaços de detectar la FA paroxística en pacients asimptomàtics, reduint el potencial d'aquests com a eines de cribatge poblacional. De tota manera, el seu ús combinat amb altres eines com els dispositius ràpids es podria explorar. En canvi, hem demostrat el potencial diagnòstic dels biomarcadors sanguinis després d'un ictus criptogènic. Cal comentar que en els cribatges poblacionals el cost benefici de realitzar monitoratges prolongats no està demostrat.<sup>77</sup> Per contra, després d'un ictus el benefici sembla més clar, tot i que no per tots els pacients.<sup>84,138</sup> En aquest context, per tant, els biomarcadors podrien ser una eina útil pels clínics a l'hora de decidir quins pacients cal prioritzar en la col·locació de dispositius Holters o implantables per realitzar seguiments més prolongats. Fins i tot, en un futur, alguns biomarcadors podrien ser útils per indicar un tractament anticoagulant sense necessitat d'evidència electrocardiogràfica de FA. A més, la combinació d'aquests marcadors amb altres que fossin capaços de diagnosticar etiologies freqüents en ictus criptogènics, com per exemple la presència de placa ateroscleròtica no estenosant, facilitaria l'adopció d'una estratègia de medicina personalitzada en el tractament secundari dels ictus criptogènics.<sup>171</sup> De fet, en un futur, segurament es desenvolupin algoritmes capaços de calcular la probabilitat de FA arrel de la combinació de biomarcadors de tipus sanguini com els estudiats en la present tesi, amb variables clíniques, i biomarcadors de tipus electrocardiogràfics fàcils de mesurar. Aquest tipus d'algoritmes es podrien aplicar en pacients amb ictus criptogènics, però també en atenció primària com a alternativa a l'aproximació seqüencial proposada anteriorment.

De totes les proteïnes estudiades en aquesta tesi, els pèptids natriurètics són els candidats més prometedors per diagnosticar FA. Tot i que el comportament de les diferents formes del pèptid natriurètic tipus B són similars, en la cerca de FA després d'un ictus, BNP podria mostrar una especificitat lleugerament millor a la de NT-proBNP. De totes maneres, els resultats dels estudis MOSES i ARCADIA en els pròxims anys seran un punt d'inflexió pel que fa a l'ús dels pèptids natriurètics en la pràctica clínica.<sup>114,115</sup>

La patofisiologia de la FA és complexa i multifactorial, amb múltiples vies implicades. Per tant, la combinació de biomarcadors representatius de diferents vies podria millorar-ne els resultats individuals. En aquesta tesi proposem explorar en un futur la combinació d'un marcador de dany endotelial com Ang-2 amb un marcador d'estrès cardíac com són els pèptids natriurètics.

De tota manera la predicció d'aquests biomarcadors segueix sense ser òptima per la seva implantació en la pràctica clínica i existeix molt marge de millora. Per tant, caldria continuar fent un esforç per identificar nous biomarcadors interessants que, a més, ens podrien ajudar a conèixer la patofisiologia de la FA i la seva relació amb la patologia cerebrovascular.

De fet, una de les principals limitacions a l'hora d'identificar nous biomarcadors per a la detecció de FA és la falta de caracterització i coneixement de la malaltia, així com l'absència d'un *gold-standard* per diagnosticar-la. A la vista dels nostres resultats, per tant, cal discutir com s'haurien de dissenyar els futurs estudis de descobriment de biomarcadors. Caldria tractar la FA com una variable continua (tenint en compte la càrrega de FA), en lloc d'una variable binària (presència o absència de FA)? O caldria dividir els grups en funció de si tenen o no cardiomiopatia atrial, en lloc de si tenen un registre electrocardiogràfic de FA?

En el context de la prevenció de l'íctus, més enllà del diagnòstic de FA, cal comptar amb una bona caracterització del risc embòlic dels pacients per determinar quina és la millor estratègia de prevenció. En aquest sentit, actualment únicament es fan servir escales clíniques com el CHADS<sub>2</sub> o el CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc. Cal plantejar si la realització de proves complementàries com la RM podrien facilitar la caracterització dels pacients amb FA. Tot i proporcionar-nos informació interessant, de moment, biomarcadors sanguinis com BMP-10, Ang-2 o FGF-23, no presenten una bona capacitat de classificació per decidir quins pacients s'haurien de sotmetre a aquestes exploracions addicionals. Per tant, cal continuar la investigació en aquest àmbit.

El seguiment longitudinal de les cohorts incloses en la present tesi o altres de similars també ens permetria conèixer el potencial dels biomarcadors testats no només per diagnosticar sinó per predir la FA i les seves complicacions. A més, també seria interessant la determinació dels biomarcadors en diferents temps per veure si els canvis longitudinals d'aquests ens poden donar més informació de la que ens dona una única mesura en un moment determinat.

Finalment, seria interessant poder incorporar aquelles molècules que demostrin la seva utilitat clínica en dispositius de mesura ràpida de tipus POC (especialment en el cas del cribratge). Alternativament, al no tractar-se d'una condició aguda, seria igualment útil incorporar la quantificació d'aquests biomarcadors en autoanàlitzadors o altres tècniques automatitzades que es poden trobar en els circuits diagnòstics dels laboratoris de la majoria d'hospitals. Cal destacar que en la present tesi ens hem centrat en l'estudi de biomarcadors proteics en sang ja que la translació clínica d'aquest tipus de biomarcadors és més fàcil amb la tecnologia actual. De totes

maneres, no descartem que en un futur altres molècules com el RNA codificant o no codificant es puguin utilitzar en aquest context.





## 6.CONCLUSIONS



---

Les conclusions de la present tesi són les següents:

1. Els biomarcadors sanguinis estudiats no tenen suficient capacitat diagnòstica per detectar casos de FA paroxística en pacients asimptomàtics, reduint-ne el potencial com a eines de cribratge poblacional. No obstant, un cribratge seqüencial combinant la utilització de biomarcadors sanguinis i dispositius ràpids podria ser viable, el cost-benefici del qual s'hauria d'avaluar en un futur.
2. Tant BNP com NT-proBNP són predictors de FA diagnosticada durant el primer mes després d'un ictus criptogènic. A més, en la nostra cohort, BNP presenta millors resultats, especialment en termes d'especificitat.
3. L'estudi de l'expressió proteica diferencial en sang de pacients amb presència o absència de FA després d'un ictus ha revelat múltiples proteïnes i vies que podrien tenir un rol en aquesta patologia. D'aquestes, DPP7 presenta concentracions més baixes en pacients amb FA i el seu paper com a biomarcador d'etiologia de l'ictus s'hauria d'explorar. Tot i així, aquesta aproximació produeix molts falsos positius i alternativament, proposem tenir en compte el concepte de cardiomiopatia atrial utilitzant paràmetres ecocardiogràfics per descobrir nous biomarcadors i vies, una estratègia que es podria utilitzar en estudis futurs.
4. La combinació de biomarcadors representatius de vies relacionades amb la FA podrien ser útils en diferents etapes de la malaltia. En concret, la combinació d'Ang-2, marcador de dany endotelial, i un pèptid natriurètic, marcador d'estrès cardíac, podria ser útil pel diagnòstic de FA tant en pacients asimptomàtics com després d'un ictus. Per altra banda, marcadors com BMP-10, Ang-2 o FGF-23 són candidats interessants per detectar lesions silents en pacients amb FA i baix risc embòlic.







## 7. BIBLIOGRAFIA



1. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-2089.
2. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204-1222.
3. Díaz-Guzmán J, Egido JA, Gabriel-Sánchez R, Barberá-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: The IBERICTUS study. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34(4):272-281.
4. Stevens E, Emmett E, Wang Y, McKeivitt C, Wolfe C. The Burden of Stroke in Europe Report. King's Coll. London Stroke Alliance Eur. 2017.
5. Comité ad hoc del grupo de estudio de enfermedades cerebrovasculares de la sociedad española de neurología. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Sociedad Española de Neurología. 2006.
6. Rudd MP, Price CI, Ford GA. Prehospital stroke scales in urban environments: A systematic review. *Neurology*. 2015;84(9):962.
7. Gomis M, Martí-Fàbregas J, Purroy F, Rodríguez Campello Ana. Protocol de Diagnòstic i Tractament de Les Malalties Vasculars Cerebrals. Societat Catalana de Neurologia. 2018.
8. Brott T, Adams HP, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: A clinical examination scale. *Stroke*. 1989;20(7):864-870.
9. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-1329.
10. Katsanos AH, Safouris A, Sarraj A, et al. Intravenous Thrombolysis with Tenecteplase in Patients with Large Vessel Occlusions: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2021; 52(1):308-312.
11. Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016;387(10029):1723-1731.
12. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*. 2018;378(1):11-21.
13. Ministerio de Sanidad. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud 2019 Aspectos destacados.  
[https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2019/Informe\\_SNS\\_2019.pdf](https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2019/Informe_SNS_2019.pdf) (2021).
14. Crichton SL, Bray BD, McKeivitt C, Rudd AG, Wolfe CDA. Patient outcomes up to 15 years after stroke: Survival, disability, quality of life, cognition and mental health. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(10):1091-1098.
15. O'Donnell MJ, Denis X, Liu L, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): A case-control study. *Lancet*. 2010;376(9735):112-123.

16. Hankey GJ. Secondary stroke prevention. *Lancet Neurol.* 2014;13(2):178-194.
17. Radu RA, Terecoasă EO, Băjenaru OA, Tiu C. Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clin Neurol Neurosurg.* 2017;159:93-106.
18. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3<sup>rd</sup>. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24(1):35-41.
19. Ornello R, Degan D, Tiseo C, et al. Distribution and temporal trends from 1993 to 2015 of ischemic stroke subtypes a systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2018;49(4):814-819.
20. Ay H, Furie KL, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2005;58(5):688-697.
21. Ay H, Benner T, Arsava EM, et al. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: The causative classification of stroke system. *Stroke.* 2007;38(11):2979-2984.
22. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. New approach to stroke subtyping: The A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(5):502-508.
23. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Wolf ME, Hennerici MG. The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovasc Dis.* 2013;36(1):1-5.
24. Arboix A, Alio J. Acute Cardioembolic Cerebral Infarction: Answers to Clinical Questions. *Curr Cardiol Rev.* 2012;8(1):54-67.
25. Hooman Kamel JSH. Cardioembolic Stroke. *Circ Res.* 2017;120(3).
26. Arboix A, Martí-Vilalta JM. Lacunar stroke. *Expert Rev Neurother.* 2009;9(2):179-196.
27. Hart RG, Diener HC, Coutts SB, et al. Embolic strokes of undetermined source: The case for a new clinical construct. *Lancet Neurol.* 2014;13(4):429-438.
28. Hart RG, Catanese L, Perera KS, Ntaios G, Connolly SJ. Embolic Stroke of Undetermined Source: A Systematic Review and Clinical Update. *Stroke.* 2017;48(4):867-872.
29. Hart RG, Sharma M, Mundl H, et al. Rivaroxaban for secondary stroke prevention in patients with embolic strokes of undetermined source: Design of the NAVIGATE ESUS randomized trial. *Eur Stroke J.* 2016;1(3):146-154.
30. Diener HC, Donald Easton J, Granger CB, et al. Design of Randomized, double-blind, Evaluation in secondary Stroke Prevention comparing the Efficacy and safety of the oral Thrombin inhibitor dabigatran etexilate vs. acetylsalicylic acid in patients with Embolic Stroke of Undetermined Source (RE-SPECT E). *Int J Stroke.* 2015;10(8):1309-1312.
31. Hart RG, Sharma M, Mundl H, et al. Rivaroxaban for Stroke Prevention after Embolic Stroke of Undetermined Source. *N Engl J Med.* 2018;378(23):2191-2201.

32. Diener H-C, Sacco RL, Easton JD, et al. Dabigatran for Prevention of Stroke after Embolic Stroke of Undetermined Source. *N Engl J Med.* 2019;380(20):1906-1917.
33. Fuentes B, Gutiérrez-Zúñiga R, Díez-Tejedor E. It's Time to Say Goodbye to the ESUS Construct. *Front Neurol.* 2020;11:1-5.
34. Schäbitz WR, Köhrmann M, Schellinger PD, Minnerup J, Fisher M. Embolic Stroke of Undetermined Source: Gateway to a New Stroke Entity? *Am J Med.* 2020;133(7):795-801.
35. Healey JS, Gladstone DJ, Swaminathan B, et al. Recurrent Stroke with Rivaroxaban Compared with Aspirin According to Predictors of Atrial Fibrillation: Secondary Analysis of the NAVIGATE ESUS Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2019;76(7):764-773.
36. Diener HC, Sacco RL, Easton JD, et al. Antithrombotic Treatment of Embolic Stroke of Undetermined Source: RE-SPECT ESUS Elderly and Renally Impaired Subgroups. *Stroke.* 2020;51(6):1758-1765.
37. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2021;42(5):373-498.
38. Lip GYH, Fauchier L, Freedman SB, et al. Atrial fibrillation. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:1-26.
39. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, et al. Prevalence of Diagnosed Atrial Fibrillation in Adults. *JAMA.* 2001;285(18):2370.
40. Rahman F, Kwan GF, Benjamin EJ. Global epidemiology of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(11):639-654.
41. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, et al. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J.* 2013;34(35):2746-2751.
42. January CT, Wann LS, Alpert JS, et al. 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2014;130(23):2071-104.
43. Noseworthy PA, Kaufman ES, Chen LY, et al. Subclinical and Device-Detected Atrial Fibrillation: Pondering the Knowledge Gap: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2019;140(25):e944-e963.
44. Chen LY, Chung MK, Allen LA, et al. Atrial Fibrillation Burden: Moving Beyond Atrial Fibrillation as a Binary Entity: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137(20):e623-e644.
45. Ganesan AN, Chew DP, Hartshorne T, et al. The impact of atrial fibrillation type on the risk of thromboembolism, mortality, and bleeding: A systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2016;37(20):1591-1602.
46. Go AS, Reynolds K, Yang J, et al. Association of burden of atrial fibrillation with risk of ischemic stroke in adults with paroxysmal atrial fibrillation: The KP-RHYTHM study. *JAMA Cardiol.* 2018;3(7):601-608.

47. Blum S, Meyre P, Aeschbacher S, et al. Incidence and predictors of atrial fibrillation progression: A systematic review and meta-analysis. *Heart Rhythm*. 2019;16(4):502-510.
48. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2007;146(12):857-867.
49. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: A meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2014;383(9921):955-962.
50. Lip GYH, Nieuwlaat R, Pisters R, et al. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: The Euro Heart Survey on atrial fibrillation. *Chest*. 2010;137(2):263-272.
51. Gage Brian F, Waterman Amy D, Shannon William, Boechler Michael, Rich Michael W RMJ. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA*. 2001;285(22):2864-2870.
52. Nattel S, Guasch E, Savelieva I, et al. Early management of atrial fibrillation to prevent cardiovascular complications. *Eur Heart J*. 2014;35(22):1448-1456.
53. Ding WY, Gupta D, Lip GYH. Atrial fibrillation and the prothrombotic state: Revisiting Virchow's triad in 2020. *Heart*. 2020;106(19):1463-1468.
54. Freedman B, Kamel H, van Gelder IC, Schnabel RB. Atrial fibrillation: Villain or bystander in vascular brain injury. *Eur Hear Journal, Suppl*. 2021;22:M51-M59.
55. Brambatti M, Connolly SJ, Gold MR, et al. Temporal relationship between subclinical atrial fibrillation and embolic events. *Circulation*. 2014;129(21):2094-2099.
56. Daoud EG, Glotzer T V, Wyse DG, et al. Temporal relationship of atrial tachyarrhythmias, cerebrovascular events, and systemic emboli based on stored device data: A subgroup analysis of TRENDS. *Heart Rhythm*. 2011;8(9):1416-1423.
57. Goette A, Kalman JM, Aguinaga L, et al. EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: Definition, characterization, and clinical implication. *Europace*. 2016;18(10):1455-1490.
58. Rivner H, Mitrani RD, Goldberger JJ. Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation. *Arrhythmia Electrophysiol Rev*. 2020;9(2):61-70.
59. Ning Y, Tse G, Luo G, Li G. Atrial Cardiomyopathy: An Emerging Cause of the Embolic Stroke of Undetermined Source. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:1-8.
60. Fanning JP, Wesley AJ, Wong AA, Fraser JF. Emerging spectra of silent brain infarction. *Stroke*. 2014;45(11):3461-3471.
61. Fanning JP, Wong AA, Fraser JF. The epidemiology of silent brain infarction: A systematic review of population-based cohorts. *BMC Med*. 2014;12(1):1-11.
62. Kalantarian S, Ay H, Gollub RL, et al. Association between Atrial fibrillation and silent cerebral infarctions: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014;161(9):650-658.

63. Escudero-Martínez I, Ocete RF, Mancha F, et al. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in patients with AF detected by 3T-MRI. *J Neurol*. 2020;267(9):2675-2682.
64. Conen D, Rodondi N, Müller A, et al. Relationships of Overt and Silent Brain Lesions With Cognitive Function in Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(9):989-999.
65. Kalantarian S, Ruskin JN. Atrial Fibrillation and Cognitive Decline: Phenomenon or Epiphenomenon? *Cardiol Clin*. 2016;34(2):279-285.
66. Engdahl J, Rosenqvist M. Large-scale screening studies for atrial fibrillation – is it worth the effort? *J Intern Med*. 2021;289(4):474-492.
67. Khurshid S, Healey JS, McIntyre WF, Lubitz SA. Population-Based Screening for Atrial Fibrillation. *Circ Res*. 2020:143-154.
68. Curry SJ, Krist AH, Owens DK, et al. Screening for atrial fibrillation with electrocardiography: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA*. 2018;320(5):478-484.
69. Engler D, Hanson C, Desteghe L, et al. Atrial fibrillation screening: feasible approaches and implementation challenges across Europe. *Eur Heart J*. 2021;42(Supplement\_1).
70. Engler D, Heidbuchel H, Schnabel RB. Digital, risk-based screening for atrial fibrillation in the European community—the AFFECT-EU project funded by the European Union. *Eur Heart J*. 2021:1-3.
71. Freedman B. Screening for Atrial Fibrillation A Report of the AF-SCREEN International Collaboration. 2017:1851-1867.
72. Zungsontiporn N, Link MS. Newer technologies for detection of atrial fibrillation. *BMJ*. 2018;363:k3946.
73. Diederichsen SZ, Haugan KJ, Kronborg C, et al. Comprehensive Evaluation of Rhythm Monitoring Strategies in Screening for Atrial Fibrillation: Insights from Patients at Risk Monitored Long Term with an Implantable Loop Recorder. *Circulation*. 2020;141(19):1510-1522.
74. Alonso A, Krijthe BP, Aspelund T, et al. Simple risk model predicts incidence of atrial fibrillation in a racially and geographically diverse population: the CHARGE-AF consortium. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(2):1-11.
75. Schnabel RB, Sullivan LM, Levy D, et al. Development of a Risk Score for Incident Atrial Fibrillation in the Community; the Framingham Heart Study. *Lancet*. 2009;373:739-745.
76. Svennberg E, Friberg L, Frykman V, Al-Khalili F, Engdahl J, Rosenqvist M. Clinical outcomes in systematic screening for atrial fibrillation (STROKESTOP): a multicentre, parallel group, unmasked, randomised controlled trial. *Lancet*. 2021;6736(21):1-9.
77. Svendsen JH, Diederichsen SZ, Højberg S, et al. Implantable loop recorder detection of atrial fibrillation to prevent stroke (The LOOP Study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2021;6736(21):1-10.
78. The SAFER Trial – Screening for Atrial Fibrillation with ECG to Reduce stroke. Retrieved February 23, 2022 from <https://www.safer.phpc.cam.ac.uk/>.



79. Pren-te el pols, campanya de prevenció de l'íctus. Retrieved October 8, 2021 from <https://www.prentelpols.cat/>.
80. Haeusler KG, Tütüncü S, Schnabel RB. Detection of Atrial Fibrillation in Cryptogenic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018;18(10):1-7.
81. Sanna T, Diener H-C, Passman RS, et al. Cryptogenic Stroke and Underlying Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2014;370(26):2478-2486.
82. Schnabel RB, Haeusler KG, Healey JS, et al. Searching for Atrial Fibrillation Poststroke: A White Paper of the AF-SCREEN International Collaboration. *Circulation*. 2019;140(22):1834-1850.
83. Gomis M, Dávalos A, Purroy F, et al. Stroke Risk Analysis, a System With a High Detection Rate of Atrial Fibrillation in Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke*. 2020;51(1):262-267.
84. Haeusler KG, Kirchhof P, Kunze C, et al. Systematic monitoring for detection of atrial fibrillation in patients with acute ischaemic stroke (MonDAFIS): a randomised, open-label, multicentre study. *Lancet Neurol*. 2021;20(6):426-436.
85. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Retrieved October 19, 2021 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>.
86. Montaner J, Ramiro L, Simats A, et al. Multilevel omics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets for stroke. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(5):247-264.
87. Kamtchum-Tatuene J, Jickling GC. Blood Biomarkers for Stroke Diagnosis and Management. *NeuroMolecular Med*. 2019;21(4):344-368.
88. Jickling GC, Sharp FR. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46(3):915-920.
89. Markus A, Valerie S, Mira K. Promising Biomarker Candidates for Cardioembolic Stroke Etiology. A Brief Narrative Review and Current Opinion. *Front Neurol*. 2021;12:624930.
90. Noubiap JJ, Sanders P, Nattel S, Lau DH. Biomarkers in Atrial Fibrillation: Pathogenesis and Clinical Implications. *Card Electrophysiol Clin*. 2021;13(1):221-233.
91. Llombart V, Antolin-Fontes A, Bustamante A, et al. B-Type Natriuretic Peptides Help in Cardioembolic Stroke Diagnosis. *Stroke*. 2015;46(5):1187-1195.
92. De Marchis GM, Schneider J, Weck A, et al. Midregional proatrial natriuretic peptide improves risk stratification after ischemic stroke. *Neurology*. 2018;90(6):e455-e465.
93. Yaghi S, Chang AD, Ricci BA, et al. Early elevated troponin levels after ischemic stroke suggests a cardioembolic source. *Stroke*. 2018;49(1):121-126.
94. Nisar T, Kamin S. Association of Serum Troponin Obtained During Stroke Codes with Cardioembolic Strokes. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020;29(3):104527.
95. Piccardi B, Giralt D, Bustamante A, et al. Blood markers of inflammation and endothelial dysfunction in cardioembolic stroke: systematic review and meta-analysis. *Biomarkers*. 2017;22(3-4):200-209.

96. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2009;101(5):929-937.
97. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke.* 2008;39(8):2280-2287.
98. Zi WJ, Shuai J. Plasma D-dimer levels are associated with stroke subtypes and infarction volume in patients with acute ischemic stroke. *PLoS One.* 2014;9(1).
99. Hanson E, Jood K, Karlsson S, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C. Plasma levels of von Willebrand factor in the etiologic subtypes of ischemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9(2):275-281.
100. Katan M, Moon YP, Paik MC, Wolfert RL, Sacco RL, Elkind MSV. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is associated with atherosclerotic stroke risk: The Northern Manhattan Study. *PLoS One.* 2014;9(1).
101. Kim BS, Jung HS, Bang OY, Chung CS, Lee KH, Kim GM. Elevated serum lipoprotein(a) as a potential predictor for combined intracranial and extracranial artery stenosis in patients with ischemic stroke. *Atherosclerosis.* 2010;212(2):682-688.
102. Jickling GC, Xu H, Stamova B, et al. Signatures of cardioembolic and large vessel ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2010;68(5):681-692.
103. Xu H, Tang Y, Liu DZ, et al. Gene expression in peripheral blood differs after cardioembolic compared with large-vessel atherosclerotic stroke: Biomarkers for the etiology of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(7):1320-1328.
104. Malik R, Chauhan G, Traylor M, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet.* 2018;50(4):524-537.
105. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic Peptides. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(25):2357-2368.
106. Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(11):698-717.
107. Buchner S, Jungbauer C, Birner C, Debl K, Riegger GA, Luchner A. Comparison of the cardiac markers B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide. *Biomark Med.* 2009;3(5):465-481.
108. Semenov AG, Feygina EE. Standardization of BNP and NT-ProBNP Immunoassays in Light of the Diverse and Complex Nature of Circulating BNP-Related Peptides. *Adv Clin Chem.* 2018;85:1-30.
109. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2016;37(27):2129-2200m.
110. Fonseca AC, Brito D, Pinho e Melo T, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide shows diagnostic accuracy for detecting atrial fibrillation in cryptogenic stroke patients. *Int J Stroke.* 2014;9(4):419-425.
111. Wasser K, Weber-Krüger M, Gröschel S, et al. Brain Natriuretic Peptide and Discovery of Atrial Fibrillation After Stroke: A Subanalysis of the Find-AFRANDOMISED Trial. *Stroke.*

- 2020;51(2):395-401.
112. Hijazi Z, Lindbäck J, Alexander JH, et al. The ABC (age, biomarkers, clinical history) stroke risk score: A biomarker-based risk score for predicting stroke in atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2016;37(20):1582-1590.
  113. Hytest. Human ProBNP, BNP and NT-ProBNP Technotes. <https://hytest.fi/resources/technotes/probnp-and-probnp-derived-peptides-bnp-and-nt-probnp-technotes> (2020).
  114. Kamel H, Longstreth WT, Tirschwell DL, et al. The AtRial Cardiopathy and Antithrombotic Drugs In prevention After cryptogenic stroke randomized trial: Rationale and methods. *Int J Stroke*. 2019;14(2):207-214.
  115. MidregiOnal Proatrial Natriuretic Peptide to Guide SEcondary Stroke Prevention (MOSES). Retrieved February 23, 2022 from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03961334>.
  116. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2006;24(8):971-983.
  117. Hathout Y. Proteomic methods for biomarker discovery and validation. Are we there yet? *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(4):329-331.
  118. Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, et al. Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS One*. 2014;9(4).
  119. Gold L, Ayers D, Bertino J, et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*. 2010;5(12).
  120. Atrial Fibrillation Research In CATalonia (AFRICAT). Retrieved February 23, 2022 from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03188484>.
  121. Lau JK, Lowres N, Neubeck L, et al. iPhone ECG application for community screening to detect silent atrial fibrillation: A novel technology to prevent stroke. *Int J Cardiol*. 2013;165(1):193-194.
  122. Proesmans T, Mortelmans C, Van Haelst R, Verbrugge F, Vandervoort P, Vaes B. Mobile phone-based use of the photoplethysmography technique to detect atrial fibrillation in primary care: Diagnostic accuracy study of the fibricheck app. *JMIR mHealth uHealth*. 2019;7(3):1-11.
  123. Tieleman RG, Plantinga Y, Rinkes D, et al. Validation and clinical use of a novel diagnostic device for screening of atrial fibrillation. *Europace*. 2014;16(9):1291-1295.
  124. Kearley K, Selwood M, Van Den Bruel A, et al. Triage tests for identifying atrial fibrillation in primary care: A diagnostic accuracy study comparing single-lead ECG and modified BP monitors. *BMJ Open*. 2014;4(5).
  125. Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, et al. Yield of atrial fibrillation detection with Textile Wearable Holter from the acute phase of stroke: Pilot study of Crypto-AF registry. *Int J Cardiol*. 2018;251:45-50.
  126. Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, et al. Large vessel occlusion is independently

- associated with atrial fibrillation detection. *Eur J Neurol*. 2020;27(8):1618-1624.
127. Delgado C, Araneda A, Behrens MI. Validation of the Spanish-language version of the Montreal Cognitive Assessment test in adults older than 60 years. *Neurologia*. 2019;34(6):376-385.
128. Somalogic Inc. SomaScan Assay V4.1 Technical note (2021).
129. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Ramachandran SV. Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med*. 2008;27(2):157-172.
130. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3(1).
131. Hochberg Y, Benjamini Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc*. 1995;57(1):289-300.
132. Reimand J, Isserlin R, Voisin V, et al. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc*. 2019;14(2):482-517.
133. Seegers J, Zabel M, Grüter T, et al. Natriuretic peptides for the detection of paroxysmal atrial fibrillation. *Open Hear*. 2015;2(1):e000182.
134. Svennberg E, Engdahl J, Al-Khalili F, Friberg L, Frykman V, Rosenqvist M. Mass screening for untreated atrial fibrillation the STROKESTOP study. *Circulation*. 2015;131(25):2176-2184.
135. Id FG, Theobald H, Rosenqvist M, Al-khalili F. Assessment of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide level in screening for atrial fibrillation in primary health care. 2019;68:1-11.
136. Kemp Gudmundsdottir K, Fredriksson T, Svennberg E, et al. Stepwise mass screening for atrial fibrillation using N-terminal B-type natriuretic peptide: the STROKESTOP II study. *Europace*. 2020;22(1):24-32.
137. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I. The dipeptidyl peptidase family, prolyl oligopeptidase and prolyl carboxypeptidase in the immune system and inflammatory disease, including atherosclerosis. *Front Immunol*. 2015;6(JUL):1-18.
138. Wachter R, Gröschel K, Gelbrich G, et al. Holter-electrocardiogram-monitoring in patients with acute ischaemic stroke (Find-AFRANDOMISED): an open-label randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2017;16(4):282-290.
139. Hillen T, Coshall C, Tilling K, Rudd AG, McGovern R, Wolfe CDA. Cause of stroke recurrence is multifactorial: Patterns, risk factors, and outcomes of stroke recurrence in the South London stroke register. *Stroke*. 2003;34(6):1457-1463.
140. SomaLogic Inc. Correlation of SOMAmer® Reagents in the SOMAscan® Assay and Commercially Available Immunoassays (2016).
141. Raffield LM, Dang H, Pratte KA, et al. Comparison of Proteomic Assessment Methods in Multiple Cohort Studies. *Proteomics*. 2020;20(12):1-34.

142. Villacorta H, Maisel AS. Soluble ST2 Testing: A promising Biomarker in the Management of Heart Failure. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106(2):145-152.
143. Wakula P, Neumann B, Kienemund J, et al. CHA2DS2-VASc score and blood biomarkers to identify patients with atrial high-rate episodes and paroxysmal atrial fibrillation. *Europace.* 2017;19(4):544-551.
144. Liu Y, Xu B, Wu N, et al. Association of MMPs and TIMPs With the Occurrence of Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Can J Cardiol.* 2016;32(6):803-813.
145. Daoud EG, Glotzer T V., Wyse DG, et al. Temporal relationship of atrial tachyarrhythmias, cerebrovascular events, and systemic emboli based on stored device data: A subgroup analysis of TRENDS. *Hear Rhythm.* 2011;8(9):1416-1423.
146. Al Khatib SM, La Pointe NMA, Chartejee R, et al. Rate- and Rhythm-Control Therapies in Patients With Atrial Fibrillation. *Ann Intern Med.* 2014;160(11):760-773.
147. Kamel H, Okin PM, Longstreth WT Jr, ElKind MSV, Soliman EZ. Atrial Cardiopathy: A Broadened Concept of Left Atrial Thromboembolism Beyond Atrial Fibrillation. *Future Cardiol.* 2015;11(3):323-331.
148. Goldberger JJ, Arora R, Green D, et al. Evaluating the Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation: Identifying the Arrhythmogenic and Thrombogenic Substrate. *Circulation.* 2015;132(4):278-291.
149. Gan GCH, Ferkh A, Boyd A, Thomas L. Left atrial function: Evaluation by strain analysis. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018;8(1):29-46.
150. Hu YF, Chen YJ, Lin YJ, Chen SA. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(4):230-243.
151. Nattel S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol.* 2017;3(5):425-435.
152. Sühling M, Wolke C, Scharf C, Lendeckel U. Proteomics and transcriptomics in atrial fibrillation. *Herzschrittmachertherapie und Elektrophysiologie.* 2018;29(1):70-75.
153. Ceyhun G. The relationship of the serum endocan level with the CHA2DS2-VASc score in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Egypt Hear J.* 2021;73(1):4-9.
154. Reyat JS, Chua W, Cardoso VR, et al. Reduced left atrial cardiomyocyte PITX2 and elevated circulating BMP10 predict atrial fibrillation after ablation. *JCI Insight.* 2020;5(16):1-16.
155. Ko D, Benson MD, Ngo D, et al. Proteomics Profiling and Risk of New-Onset Atrial Fibrillation: Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(6).
156. Choudhury A, Freestone B, Patel J, Lip GYH. Relationship of soluble CD40 ligand to vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and tissue factor in atrial fibrillation: A link among platelet activation, angiogenesis, and thrombosis? *Chest.* 2007;132(6):1913-1919.
157. Liu B, Li X, Zhao C, et al. Proteomic Analysis of Atrial Appendages Revealed the Pathophysiological Changes of Atrial Fibrillation. *Front Physiol.* 2020;11:1-8.

158. Piek A, Suthahar N, Voors AA, de Boer RA, Silljé HHW. A combined bioinformatics, experimental and clinical approach to identify novel cardiac-specific heart failure biomarkers: is Dickkopf-3 (DKK3) a possible candidate? *Eur J Heart Fail.* 2020;22(11):2065-2074.
159. Freestone B, Chong AY, Lim HS, Blann A, Lip GYH. Angiogenic factors in atrial fibrillation: A possible role in thrombogenesis? *Ann Med.* 2005;37(5):365-372.
160. Blum S, Aeschbacher S, Meyre P, et al. Insulin-like growth factor-binding protein 7 and risk of congestive heart failure hospitalization in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2021.
161. Balch MHH, Nimjee SM, Rink C, Hannawi Y. Beyond the brain: The systemic pathophysiological response to acute ischemic stroke. *J Stroke.* 2020;22(2):159-172.
162. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-397.
163. Perini F, Morra M, Alecci M, Galloni E, Marchi M, Toso V. Temporal profile of serum anti-inflammatory and pro-inflammatory interleukins in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci.* 2001;22(4):289-296.
164. Fonseca AC, Matias JS, e Melo TP, et al. Time course of NT-proBNP levels after acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2013;128(4):235-240.
165. Drew DA, Katz R, Kritchevsky S, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Blood Pressure in Older Adults: The Health, Aging, and Body Composition Study. *Hypertension.* 2020;76(1):236-243.
166. Adela R, Mohammed SA, Kanwal A, Vishwakarma G, Reddy PNC, Banerjee SK. Elevated levels of GDF-15 is associated with increased angiotensin II in hypertensive patients with Type 2 diabetes. *Per Med.* 2016;13(4):325-336.
167. Ibrahim NE, Afilalo M, Chen-Tournoux A, et al. Diagnostic and Prognostic Utilities of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-7 in Patients With Dyspnea. *JACC Heart Fail.* 2020;8(5):415-422.
168. Hijazi Z, Oldgren J, Lindbäck J, et al. The novel biomarker-based ABC (age, biomarkers, clinical history)-bleeding risk score for patients with atrial fibrillation: a derivation and validation study. *Lancet.* 2016;387(10035):2302-2311.
169. Wright CB, Shah NH, Mendez AJ, et al. Fibroblast Growth Factor 23 is Associated with Subclinical Cerebrovascular Damage: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Stroke.* 2016;47(4):923-928.
170. Krisai P, Eken C, Aeschbacher S, et al. Biomarkers, Clinical Variables, and the CHA2DS2-VASc Score to Detect Silent Brain Infarcts in Atrial Fibrillation Patients. *J Stroke.* 2021;23(3):449-452.
171. Ntaios G, Pearce LA, Veltkamp R, et al. Potential Embolic Sources and Outcomes in Embolic Stroke of Undetermined Source in the NAVIGATE-ESUS Trial. *Stroke.* 2020:1797-1804.





## 8.ANNEX





**Cardioembolic Ischemic Stroke Gene Expression Fingerprint in Blood: a Systematic  
Review and Verification Analysis**

(García-Berrocso et al, Transl Stroke Res. 2020 Jun;11(3):326-336.)

doi: 10.1007/s12975-019-00730-x.

---



## CARRERA CIENTÍFICA DE LA DOCTORANDA

### Formació acadèmica universitària

---

- **Doctorat en Neurociències** (2018-2022). Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya. Laboratori d'Investigació Neurovascular (LIN). Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR), Barcelona.
- **Màster oficial en anàlisis clíniques** (2015-2016). Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Espanya.
- **Grau en Genètica** (2011-2015). Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya.

### Producció científica

---

- **Palà E**, Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, Penalba A, Rodriguez M, De Lera Alfonso M, Arenillas JF, Cabezas JA, Moniche F, de Torres R, Perez-Sanchez S, González-Alujas T, Molina CA, Bustamante A, Montaner J. *Proteins and pathways in atrial fibrillation and atrial cardiomyopathy underlying cryptogenic stroke*. Accepted for publication: February 2022.
- Abellana R, Gonzalez-Loyola F, Verdu-Rotellar JM, Bustamante A, **Palà E**, Clua-Espuny JL, Montaner J, Pedrote A, Del Val-Garcia JL, Ribas Seguí D, Muñoz MA. *Predictive model for atrial fibrillation in hypertensive diabetic patients*. Eur J Clin Invest. 2021 Dec;51(12):e13633.
- Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, Bustamante A, Penalba A, **Pala E**, Rodriguez M, De Lera-Alfonso M, Arenillas JF, Cabezas JA, Moniche F, de Torres R, Montaner J, González-Alujas T, Alvarez-Sabin J, Molina CA; Crypto-AF study group. *Predicting Atrial Fibrillation with High Risk of Embolization with Atrial Strain and NT-proBNP*. Transl Stroke Res. 2021 Oct;12(5):735-741.
- Jiménez-Balado J, Pizarro J, Riba-Llena I, Penalba A, Faura J, **Palà E**, Montaner J, Hernández-Guillamon M, Delgado P. *New candidate blood biomarkers potentially associated with white matter hyperintensities progression*. Sci Rep. 2021 Jul 12;11(1):14324.
- **Palà E**, Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, Bustamante A, Penalba A, Comas I, Rodriguez M, De Lera Alfonso M, Arenillas JF, de Torres R, Pérez-Sánchez S, Cabezas JA, Moniche F, González-Alujas T, Molina CA, Montaner J. *B-type natriuretic peptide over N-terminal probrain natriuretic peptide to predict incident atrial fibrillation after cryptogenic stroke*. Eur J Neurol. 2021 Feb;28(2):540-547.
- Clua-Espuny JL, Muria-Subirats E, Ballesta-Ors J, Lorman-Carbo B, Clua-Queralt J, **Palà E**, Lechuga-Duran I, Gentile-Lorente D, Bustamante A, Muñoz MÁ, Montaner J; AFRICAT Research Group. *Risk of Atrial Fibrillation, Ischemic Stroke and Cognitive Impairment: Study of a Population Cohort ≥65 Years of Age*. Vasc Health Risk Manag. 2020 Oct 28;16:445-454.

- Pagola J, Juega J, Francisco-Pascual J, Bustamante A, Penalba A, **Pala E**, Rodriguez M, De Lera Alfonso M, Arenillas JF, Cabezas JA, Moniche F, de Torres R, Montaner J, González-Alujas T, Alvarez-Sabin J, Molina CA; Crypto-AF study group. *Large vessel occlusion is independently associated with atrial fibrillation detection*. Eur J Neurol. 2020 Aug;27(8):1618-1624.
- **Palà E**, Bustamante A, Jolkkonen J, Hommel M, Rosell A, Montaner J. *Blood-based biomarkers and stem cell therapy in human stroke: a systematic review*. Mol Biol Rep. 2020 Aug;47(8):6247-6258.
- García-Berrocoso T, **Palà E**, Consegal M, Piccardi B, Negro A, Gill N, Penalba A, Huerga Encabo H, Fernández-Cadenas I, Meisel A, Meisel C, Jickling GC, Muñoz MÁ, Clúa-Espuny JL, Pedrote A, Pagola J, Juega J, Bustamante A, Montaner J. *Cardioembolic Ischemic Stroke Gene Expression Fingerprint in Blood: a Systematic Review and Verification Analysis*. Transl Stroke Res. 2020 Jun;11(3):326-336.
- **Palà E**, Bustamante A, Clúa-Espuny JL, Acosta J, Gonzalez-Loyola F, Ballesta-Ors J, Gill N, Caballero A, Pagola J, Pedrote A, Muñoz MA, Montaner J. *N-Terminal Pro B-Type Natriuretic Peptide's Usefulness for Paroxysmal Atrial Fibrillation Detection Among Populations Carrying Cardiovascular Risk Factors*. Front Neurol. 2019 Nov 29;10:1226.

#### Participació en projectes d'investigació

- PROOF: Penumbra Rescue by Normobaric O<sub>2</sub> Administration in Patients With Ischaemic Stroke and Target Mismatch Profile: A Phase II Proof-of-Concept Trial. Grant agreement num 733379.
- PRESTIGE-AF: PREvention of STroke in Intracerebral hemorrhage survivors with Atrial Fibrillation. Grant Agreement num 754517. Unió Europea Horizon 2020.
- AFFECT-EU: Digital, risk-based screening for atrial fibrillation in the European community. Grant agreement num 847770. Unió Europea Horizon H2020.
- RESSTORE: REgenerative Stem cell therapy for STroke in Europe. Grant agreement 681044.
- ODEA-TIA: Optimal DETection of Atrial fibrillation in Transient Ischemic Attack.
- AFRICAT: Atrial Fibrillation Research In CATalonia: Sequential clinic electrical biological screening among high risk individuals (201528-30-31-3). La Marató de TV3. IP: Joan Montaner.
- RICORS-ICTUS-Enfermedades Vasculares Cerebrales, RD21/0006/0007 (2022-2024). Instituto de Salud Carlos III. Neurovascular Research Laboratory, VHIR, Spain. IP: Anna Rosell.
- Validación diagnóstica y clínica de una pulsera inteligente para la detección de fibrilación auricular paroxística en pacientes con ictus criptogénico. PI20/01281. IP: Jorge Pagola.

- Assistència a la **8th AFNET/EHRA Consensus Conference** “Early diagnosis and precision treatment of atrial fibrillation in the digital era”. 12-14 octubre de 2021, Hamburg.
- Assistència i presentació d’una comunicació en format pòster a la **7th European Stroke Organization Conference (ESOC)**. 1-3 de setembre de 2021, online. Títol de la presentació: *Blood-based biomarkers to identify atrial fibrillation in high-risk asymptomatic individuals and cryptogenic stroke patients.*
- Assistència i presentació d’una comunicació oral en el **Biomarker day 2021** (Universitat de Ginebra). 17 de març de 2021, online. Títol de la presentació: *Blood biomarkers to detect atrial fibrillation as part of a primary stroke prevention strategy.*
- Assistència i presentació d’una comunicació en format pòster a la **6th European Stroke Organization Conference (ESOC)**. 7-9 de novembre de 2020, online. Títol del pòster: *Direct comparison of BNP and NT-proBNP to predict atrial fibrillation in cryptogenic stroke patients*
- Assistència i presentació d’una comunicació oral en la **LXXI Reunió Anual de la Societat Espanyola de Neurologia (SEN)**. 19-23 de novembre de 2019, Sevilla. Títol de la presentació: *La utilidad de un panel de biomarcadores sanguíneos para la detección de fibrilación auricular como estrategia de prevención primaria del ictus.*
- Assistència i presentació d’una comunicació oral a les **VII Scientific Conferences of the INC-UAB**. 1-3 d’octubre de 2019, Sant Feliu de Guíxols. Títol de la presentació: *Blood biomarkers to detect atrial fibrillation as part of a primary stroke prevention strategy: discovery and verification study.*
- **Curs de Bioinformàtica per a la Recerca Biomèdica**. Fundació Hospital Universitari Vall d’Hebrón Institut de Recerca. 19 de novembre- 3 de desembre de 2018.
- **Marco Legal y Aspectos Prácticos en la Realización de Ensayos Clínicos y Estudios Observacionales**. 14ª Edición: 6 de juliol de 2018. Col·legi de Metges de Barcelona.

