

**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.

# TESIS DOCTORAL

Barcelona 2024

## Estudio y utilidad clínica de los biomarcadores sanguíneos en el diagnóstico del Ataque Isquémico Transitorio

Daisy Guamán-Pilco

---

Doctorado en Neurociencias

Universitat Autònoma de Barcelona

Laboratorio de Investigación Neurovascular

Vall d'Hebrón Intituto de Recerca (VHIR)

---

DIRECTOR:

Joan Montaner

TUTOR:

Joan Montaner

Esta tesis doctoral ha sido llevada a cabo en el laboratorio de investigación Neurovascular del Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR). El laboratorio de Investigación Neurovascular forma parte de la red de investigación RICORS-ICTUS (RD21/0006/0007) y está parcialmente financiado por el Fons de Investigacions Sanitàries (PI15/00354 i PI18/00804) y co-financiado por el Instituto de Salud Carlos III y el fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

A mi madre

## Agradecimientos

No sé cómo comenzar a cerrar esta etapa de mi vida que culmina hoy en estas páginas. Lo primero que viene a mi mente es la frase que he escuchado constantemente en mi vida: *'El viaje más importante no es el que hacemos de un lugar a otro, sino el que vivimos dentro de nosotros mismos'*, y hoy cobra más sentido que nunca. Siento que este es el espacio más valioso de la tesis, porque nada de esto existiría tal como es sin las personas que me han acompañado en este camino. Hay tantas personas a las que quisiera expresar mi gratitud, y quiero comenzar agradeciendo a **Joan Montaner**, por abrirme las puertas al grupo de Neurovascular, donde encontré no solo un equipo, sino una segunda familia.

A **Pilar** por apoyarme y acompañarme durante mi segundo año de doctorado y mi único año de Máster, gracias por la paciencia y por la manera tan dulce de dirigirme. Y a Mar y a Anna por sus palabras en los lab meetings.

A **Elena**, por acompañarme y abrazarme desde el día uno en el laboratorio. Gracias por secar mis lágrimas, calmar mi ansiedad y compartir sonrisas diarias. Gracias por las intensas jornadas de trabajo y las profundas charlas de aprendizaje que me has dado. Gracias por ser la mejor guía que jamás pude tener.

A **Júlia Faura**, aunque compartí poco tiempo contigo te llevaste gran parte de mi corazón. Gracias por tu calidez al recibirme, por tus recomendaciones, y por ser la persona que eres.

A *Paula*, por convertirse en mi hermana de lucha durante esta travesía.  
Gracias por los abrazos y por todo el amor que me has dado.

A *Elvira*, por dejarme fluir y ayudarme a encontrarme a mí misma durante todo este tiempo, por la amistad tan linda que hemos forjado.

A todo el equipazo del VHIR que me han ayudado en todo momento, pero en especial a Vicky que siempre me ayudo a mantener limpia mi área de trabajo y a Jesús que me cuida y me ayudo a sobrevivir las noches que me quedaba en el lab.

Finalmente, a las nuevas incorporaciones que son el futuro del lab, gracias por acompañarme al final de este viaje.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN:</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT:</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIACIONES:</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1 Ictus .....	10
1.1.1 Descripción.....	10
1.1.2 Epidemiología .....	12
1.1.3 Etiología .....	15
1.2. Ataque isquémico transitorio.....	19
1.2.1 Descripción y manifestación clínica.....	19
1.2.2 Diagnóstico AIT .....	23
1.3. Biomarcadores sanguíneos .....	27
1.3.1 Aspectos básicos.....	27
1.3.2 Biomarcadores y diagnóstico de AIT .....	30
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 Colección de muestras.....	39
3.2 Panel de biomarcadores.....	40
3.3 Medición de biomarcadores .....	41
3.4 Análisis estadístico.....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1 H-FABP as a Biomarker in Transient Ischemic Attack</b> .....	<b>47</b>
.....	48
<b>4.2 A panel of blood biomarkers for the diagnosis of transient ischemic attacks</b> .....	<b>59</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>87</b>
5.1 Biomarcadores para la evaluación de la isquemia cerebral.....	88
5.2 H-FABP como biomarcador en el diagnóstico preciso del AIT .....	90
5.2.1 H-FABP.....	90
5.2.2 H-FABP en el contexto de la neuroimagen.....	91
5.2.3 H-FABP en el AIT .....	92
5.2.4 Uso de técnicas POCT.....	94
5.2.5 Limitaciones y perspectivas de futuro.....	95
5.3 Panel de Biomarcadores en el contexto del AIT .....	96
5.3.1 Papel de ApoC-III en el AIT .....	96
5.3.2 Papel de IL6 y vWF en el AIT .....	98
5.3.3 Otros biomarcadores en AIT .....	101

5.3.4 Limitaciones y perspectivas de futuro.....	103
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>120</b>
ANEXO 1 .....	121

## RESUMEN:

El Ataque Isquémico Transitorio (AIT) es un evento vascular breve caracterizado por la obstrucción o reducción temporal del flujo sanguíneo a una parte del cerebro, lo que provoca una disfunción neurológica transitoria sin producir un infarto perceptible. A pesar de su naturaleza efímera, el AIT plantea un importante problema de salud pública debido a su asociación con un mayor riesgo de ictus posterior. En este contexto el diagnóstico y el tratamiento rápido son cruciales, ya que hasta el 80% de los ictus que siguen a un AIT pueden prevenirse.

Diagnosticar con precisión un AIT plantea dificultades, sobre todo debido a la evolución de los conocimientos sobre su definición y al solapamiento con otras afecciones que imitan sus síntomas. En este sentido, los biomarcadores sanguíneos han surgido como herramientas potenciales para mejorar el diagnóstico, la estratificación del riesgo y la individualización del tratamiento en pacientes AIT.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo evaluar posibles biomarcadores que aporten valor al diagnóstico clínico preciso del AIT, empleando técnicas de laboratorio como inmunoensayos (ELISAS) y el uso de Pruebas de Laboratorio en el lugar de Asistencia (POCT siglas en inglés de Point of care test). Los objetivos específicos de esta tesis son: 1) Evaluar un panel de biomarcadores para el diagnóstico precoz del AIT. 2) Evaluar el papel de H-FABP como marcador para el diagnóstico preciso de AIT frente a un evento que simula un ictus. 3) Evaluar el papel de H-FABP como marcador para identificar lesiones isquémicas en la resonancia.

Para alcanzar los objetivos anteriormente descritos, esta tesis doctoral utiliza muestras de sangre de dos cohortes diferentes. La primera cohorte provino del estudio multicentro StrokeChip llevado a cabo en el año 2022, y la segunda cohorte proviene de una colección de muestras almacenadas en el Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), que contaban con datos de imagen potenciada en difusión (DWI por sus siglas en inglés - Diffusion weighted image-) en resonancia magnética (RM).

Los resultados del primer estudio mostraron que Apo -CIII, IL-6 y vWF fueron los más eficaces para discriminar a los AIT de los imitadores tras el ajuste por variables clínicas. El área bajo la curva ROC (AUC) fue de 0,73 para ApoC-III; 0,74 para IL-6; 0,74 para vWF; y 0,72 para el modelo clínico. La prueba de razón de verosimilitud indicó que estos biomarcadores tenían mejor ajuste que el modelo clínico por sí solo: Apo-CIII ( $p \leq 0,031$ ), IL-6 ( $p \leq 0,030$ ), y vWF ( $p \leq 0,040$ ). Los resultados del PanelomiX indican los siguientes puntos de cohorte para las variables numéricas del modelo final Apo-CIII  $>132,29$  ng/mL , IL-6  $>5,45$  pg / mL , vWF  $<280,09\%$ , puntuación NIHSS  $>4,5$  y edad  $>41,5$  años con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 28% para distinguir los AIT de los mímicos, siendo un caso positivo cuando dos de los criterios se cumple.

Los resultados del segundo estudio revelaron que los niveles de H-FABP más elevados estaban en los individuos con AIT en comparación con los simuladores de AIT [3,10 ng/ mL (IQR 2,13-4,78) frente a 1,70 ng/ mL (RIC 1,23-2,38)] ( $p < 0,001$ ). El rendimiento diagnóstico de H-FABP, evaluado mediante el AUC, fue de 0,83 (IC del 95%: 0,76-0,90) para el modelo final, lo que indica una buena capacidad discriminativa. El software PanelomiX determinó un punto de corte combinado de  $>1,85$  ng/ml para H-FABP, edad

>42,5 años y NIHSS basal >3,5 con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 23,30%.

Conclusiones: Los estudios presentados en esta tesis indican que los biomarcadores sanguíneos, especialmente Apo-CIII, IL-6, vWF y H-FABP, pueden mejorar significativamente el diagnóstico precoz y preciso del AIT, diferenciándolo de otras condiciones que imitan sus síntomas. Además, aunque las técnicas de medición de biomarcadores siguen planteando dificultades, las pruebas en el punto de atención sanitaria prometen mejorar la accesibilidad y la eficacia, por lo cual, los resultados de la segunda cohorte respaldan el posible uso del POCT en los servicios de urgencias y en los centros de atención primaria. Sin embargo, los resultados de este trabajo son preliminares, por lo que se requiere llevar a cabo investigaciones adicionales con muestras más grandes para validar estos hallazgos y establecer su utilidad clínica definitiva.

## **ABSTRACT:**

Transient ischemic attack (TIA) is a brief vascular event characterized by temporary obstruction or reduced blood flow to a part of the brain, causing transient neurological dysfunction without producing a perceptible infarct. Despite its ephemeral nature, TIA poses a significant public health problem due to its association with an increased risk of subsequent stroke. In this context, prompt diagnosis and treatment are crucial, as up to 80% of strokes following a TIA can be prevented.

Accurately diagnosing a TIA poses difficulties, mainly due to evolving knowledge about its definition and overlap with other conditions that mimic its symptoms. In this regard, blood biomarkers have emerged as potential tools to improve diagnosis, risk stratification, and individualization of treatment in TIA patients.

This PhD thesis aims to evaluate potential biomarkers that add value to the accurate clinical diagnosis of TIA using laboratory techniques such as immunoassays (ELISA) and the use of Point-of-Care Laboratory Tests (POCT). The specific objectives of this thesis are: 1) To evaluate a panel of biomarkers for the early diagnosis of TIA. 2) To evaluate the role of H-FABP as a marker for the accurate diagnosis of TIA versus an event that mimics a stroke. 3) To evaluate the role of H-FABP as a marker to identify ischemic lesions on MRI.

This PhD thesis uses blood samples from two cohorts to achieve the objectives described above. The first cohort came from the multicenter StrokeChip study conducted in 2022, and the second cohort came from a collection of samples

stored at the Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), which had diffusion-weighted imaging (DWI) data on magnetic resonance imaging (MRI).

The results of the first study showed that Apo-CIII, IL-6, and vWF were the most effective in discriminating TIAs from mimics after adjustment for clinical variables. The area under the ROC curve (AUC) was 0.73 for ApoC-III, 0.74 for IL-6, 0.74 for vWF, and 0.72 for the clinical model. The likelihood ratio test indicated that these biomarkers had better fit than the clinical model alone: Apo-CIII ( $p \leq 0.031$ ), IL-6 ( $p \leq 0.030$ ), and vWF ( $p \leq 0.040$ ). The PanelomiX results indicate the following cohort points for the final model numerical variables: Apo-CIII  $>132.29$  ng/mL, IL-6  $>5.45$  pg/mL, vWF  $<280.09\%$ , NIHSS score  $>4.5$ , and age  $>41.5$  years with a sensitivity of 100% and a specificity of 28% to distinguish TIAs from mimics, with a positive case being when two of the criteria are met.

The results of the second study revealed that the highest H-FABP levels were in individuals with TIA compared to TIA simulators [3.10 ng/mL (IQR 2.13-4.78) vs. 1.70 ng/mL (IQR 1.23-2.38)] ( $p < 0.001$ ). The diagnostic performance of H-FABP, assessed by AUC, was 0.83 (95% CI: 0.76-0.90) for the final model, indicating good discriminatory ability. PanelomiX software determined a combined cutoff of  $>1.85$  ng/mL for H-FABP, age  $>42.5$  years, and baseline NIHSS  $>3.5$  with a sensitivity of 100% and specificity of 23.30%.

Conclusions: The studies presented in this thesis indicate that blood biomarkers, especially Apo-CIII, IL-6, vWF, and H-FABP, can significantly improve TIA's early and accurate diagnosis, differentiating it from other conditions that mimic its symptoms. Furthermore, although biomarker measurement techniques remain challenging, point-of-care testing promises to

improve accessibility and efficacy, and the results of the second cohort, therefore, support the potential use of POCT in emergency departments and primary care settings. However, the results of this work are preliminary, and further research with larger samples is required to validate these findings and establish their definitive clinical utility.

## ABREVIACIONES:

AIT	Ataque isquémico transitorio
TOAST	Del inglés Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
OMS	Organización Mundial de la Salud
HTA	Hipertensión Arterial
RM	Resonancia Magnética
TC	Tomografía Computacional
FA	Fibrilación Auricular
NIH	Del inglés National Institute of Health
POCT	Del inglés Point of care test
Apo-CIII	Del inglés apolipoprotein CIII
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
PCR	proteína C reactiva
GROA	Del inglés growth-related oncogene- $\alpha$
AUC	Del inglés Area Under de Curve
ROC	Del inglés Receiver Operating Characteristic Curve
DWI	Del inglés Diffusion weighted image
STEMI	Del inglés ST-elevation myocardial infarction
ATIII	Antitrombina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
NMDA	Del inglés N-methyl-D-aspartate

NDKA	Del inglés Nucleoside Diphosphate Kinase A
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
UFD1	Proteína de degradación de fusión de ubiquitina 1
hsCRP	Proteína C reactiva de alta sensibilidad
sCD40L	Ligando CD40 soluble
ApoC-III	Apolipoproteína CIII
GROA	Oncogén $\alpha$ relacionado con el crecimiento
LRT	Del inglés Likelihood ratio test
TRL	Del inglés Triglyceride-rich lipoproteins
FT	Factor Tisular
IL-6	Del inglés Interlukine-6
NT-proBNP	Del inglés N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
VAP-1	Del inglés vascular adhesion protein-1
vWF	Del inglés von Willebrand factor
HFABP	Del inglés Heart-Fatty Acid Binding Protein

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Ictus

#### 1.1.1 Descripción

Para tener una mejor comprensión de lo que es un ictus es importante hacer un breve repaso de lo que pasa en nuestro organismo a nivel fisiológico. Como sabemos la sangre se bombea desde el corazón al resto del cuerpo, incluido el cerebro. Para que la sangre llegue al cerebro debe pasar a través de las arterias carótida interna y vertebral, las cuales se ramifican y posteriormente se unen para formar la arteria basilar. Esta unión anastomótica entre las circulaciones anterior y posterior, ubicada en la parte inferior del cerebro, se conoce como Círculo de Willis. Esta estructura distribuye la sangre de manera uniforme por todo el cerebro, por lo que la obstrucción o rotura de una arteria dentro del círculo de Willis puede provocar un ictus (Figura 1a) [1].

El ictus en rasgos generales es conocido por ser un evento vascular grave y multifactorial que abarca un amplio espectro de patologías cerebrovasculares. Este trastorno neurológico afecta el parénquima cerebral, provocando daño tisular grave y pérdida de funciones neurológicas.

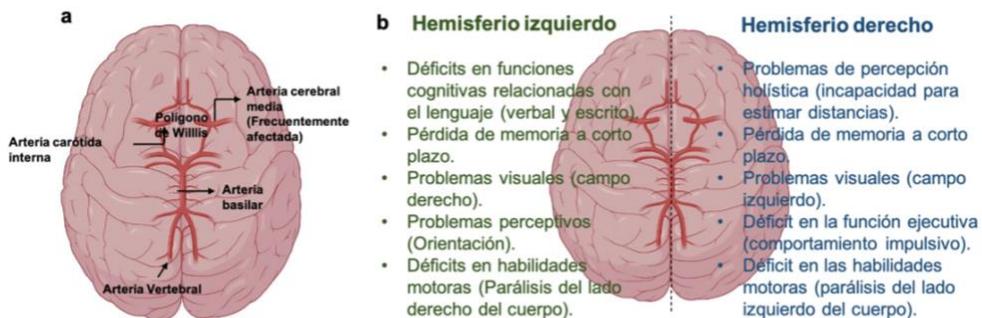
Este trastorno vascular se divide en dos tipos principales: El ictus isquémico y el ictus hemorrágico. El primer tipo, ictus isquémico, se caracteriza por una interrupción o disminución repentina del flujo sanguíneo y es el tipo más común de ictus. Esta alteración se debe a la formación de un coágulo que bloquea el flujo de sangre al cerebro. Como resultado, el área del cerebro afectada se ve privada de oxígeno y nutrientes esenciales, que eventualmente provoca la muerte celular y un daño cerebral grave.

El segundo tipo, ictus hemorrágico, ocurre cuando un vaso sanguíneo que irriga sangre al cerebro se rompe, lo que provoca una hemorragia dentro del

cerebro. Esta ruptura puede causar un daño significativo al aumentar la presión intracraneal y reducir el suministro de sangre al tejido cerebral circundante, por lo que la mortalidad en este caso es muy alta.

En ambos casos, los resultados pueden ser devastadores, induciendo la muerte de partes del tejido cerebral y provocando múltiples discapacidades físicas y cognitivas. En el peor de los casos, puede resultar en la muerte del paciente.

Los síntomas del ictus varían dependiendo de la ubicación de la arteria afectada, ya sea en el hemisferio derecho o izquierdo, o en las regiones superior o inferior (Figura 1b).



**Figura 1a** Muestra las principales arterias que forman el círculo de Willis. Creado con BioRender.com. **Figura 1b** Muestra los diferentes síntomas del ictus según el hemisferio afectado.

Para ayudar en la identificación rápida del ictus, se ha desarrollado el acrónimo **FAST**-por sus siglas en inglés- (**F**ace drooping -*Caída de la una parte de la cara*-, **A**rm weakness -*Debilidad en los brazos*-, **S**peech difficulties -*Dificultad para hablar*-, **T**ime to call emergency services -*Tiempo de llamar a emergencias*-). Este recurso mnemónico está dirigido a ayudar al público a

reconocer posibles ictus, reduciendo así el tiempo entre la aparición de los síntomas y la intervención médica. Es esencial recordar que el tratamiento oportuno es crucial para minimizar los resultados adversos y mejorar las perspectivas de recuperación (Tabla 1).

**Tabla 1** Resumen de los principales síntomas de un ictus en la palabra FAST

<b>Face</b>	<b>Arm</b>	<b>Speech</b>	<b>Time</b>
Puede haberse caído de un lado del rostro y no poder sonreír.	Es posible que no pueda levantar ambos brazos y mantenerlos allí.	Puede arrastrar las palabras, ser confuso o no poder hablar en absoluto.	Llamar a los servicios de emergencia si se ha notado alguno de estos síntomas.

### 1.1.2 Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ictus es la segunda causa de muerte y la tercera causa de discapacidad en todo el mundo [2] [3]. En Europa, es la segunda causa más común de muerte y una de las principales causas de discapacidad, afectando a 1,1 millones de habitantes cada año [4]. Mientras que la mortalidad asciende a más de 1 millón de muertes anuales, el 15% de estas muertes ocurren prematuramente, antes de los 65 años [5].

El ictus es también la principal causa de ingreso hospitalario por enfermedades neurológicas y la causa más frecuente de demanda de atención en servicios para enfermedades neurológicas graves [6]. Este aumento de la tasa de hospitalización pone en relieve la importante carga que las enfermedades cardiovasculares suponen para los sistemas sanitarios.

Como se mencionó anteriormente, el ictus es una enfermedad heterogénea con una gran variedad de factores de riesgo aditivos. Numerosos factores de riesgo se asocian con un ictus, siendo los más frecuentes: Edad, sexo, genética, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus, obesidad y tabaquismo. Es importante destacar que cinco de estos factores de riesgo (hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus, obesidad y tabaquismo) son modificables [7]. Interesantemente, el estudio INTERSTROKE encontró que algunos de los factores de riesgo modificables, como la actividad física, la dieta y la hipertensión arterial (HTA), son responsables del 90% del riesgo de sufrir un ictus [8].

A pesar de un mejor control de los factores de riesgo vascular, el aumento de la incidencia y prevalencia del ictus ha seguido incremento en los últimos años. Este aumento de incidencias a lo largo del tiempo se explica mejor por el envejecimiento de la población. Los procesos relacionados con la aparición del ictus, comunes en una edad avanzada, son la disminución del flujo sanguíneo de la microcirculación, la alteración de la angiogénesis y el desarrollo de aterosclerosis [9]. Por lo tanto, el envejecimiento no sólo es un importante factor de riesgo, sino también un indicador de malos resultados.

Por otro lado, un segundo factor indicativo de un alto riesgo de sufrir ictus es el sexo. En concreto, el estudio realizado por Sohrabji et al; indica que los esteroides sexuales femeninos son un factor protector contra el ictus. Esto se debe a que los astrocitos femeninos producen mayores cantidades de factores de crecimiento que los astrocitos masculinos. Sin embargo, a medida que los procesos de envejecimiento avanzan los niveles de estrógeno disminuyen. Por lo que después de la menopausia, las mujeres mayores muestran una

mortalidad significativamente mayor y peores resultados tras un ictus que los hombres mayores [10].

Sólo en España, los datos de la Encuesta de Morbilidad Hospitalaria del Instituto Nacional de Estadística indican que en 2023 se registraron 23.173 muertes por ictus [11]. Esto indica que el ictus conlleva importantes cargas socioeconómicas, las cuales afectan a la atención sanitaria y a los servicios sociales. Los supervivientes de un primer ictus se enfrentan a un alto riesgo de sufrir otro ictus, con un riesgo cada vez mayor de hemorragia durante los seis meses siguientes. Asimismo, las tasas de mortalidad pueden aumentar entre un 10% y un 12% dentro de los primeros 30 días después de un derrame cerebral posterior [12].

El 87% de los ictus son isquémicos y ocurren cuando se obstruye un vaso que suministra sangre al cerebro. Este tipo de ictus puede resultar de una estenosis gradual (aterotrombosis) o de una oclusión repentina (embolia) de una de las arterias cerebrales. El 13% restante de los ictus son hemorrágicos, los cuales son causados por la rotura de un vaso sanguíneo y el posterior sangrado en el tejido cerebral circundante. El ictus hemorrágico se clasifica en hemorragia intracraneal (ubicada en el parénquima cerebral) y hemorragia subaracnoidea (ubicada en la superficie del cerebro). A pesar de su menor frecuencia en comparación con los isquémicos, este tipo de ictus representa la tasa de mortalidad más alta y sus consecuencias son más graves tanto a nivel físico como cognitivo [13].

Dentro de la clasificación de los ictus isquémicos se encuentran el ataque isquémico transitorio (AIT) y el ictus isquémico menor, ambos causados por un coágulo de sangre. Por una parte, el AIT se caracteriza por una corta

duración de la interrupción del flujo sanguíneo y una rápida resolución de los síntomas y se consideran una señal de advertencia de un ictus futuro. Mientras que la duración de los síntomas del ictus isquémico menor es más prolongada, siendo más leves que un ictus agudo y suele durar más de 24 horas. Asimismo, este tipo de ictus puede dejar evidencia de daño cerebral permanente, aunque usualmente menos grave que el ictus establecido. Aunque a menudo se confunden o se usan indistintamente, los AIT y los ictus isquémicos menores se diferencian clínicamente y mediante hallazgos de neuroimagen (figura 2) [14] [15].

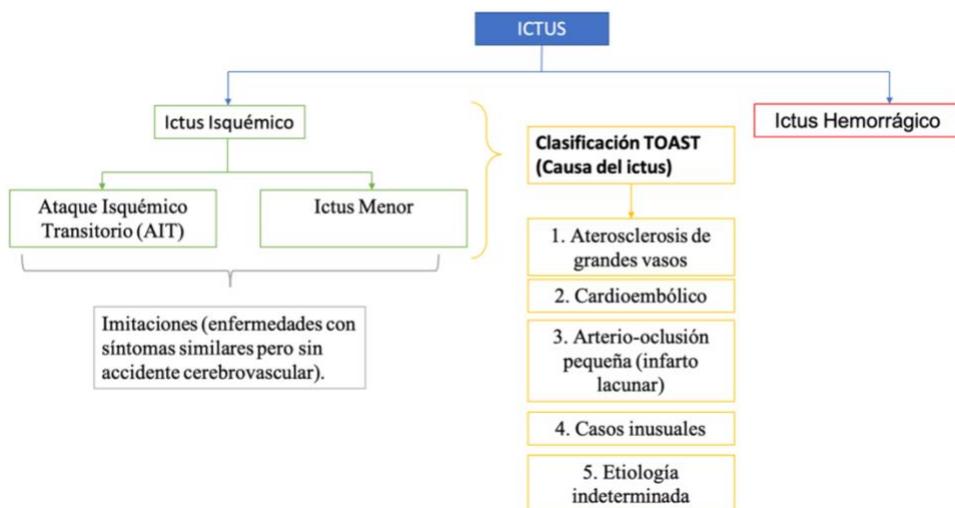


Figura 2 Esquema de la clasificación del ictus.

### 1.1.3 Etiología

La etiología se refiere a la causa u origen de una enfermedad. En el caso del ictus isquémico se puede subdividir según la distribución vascular que a menudo está influenciado por factores de riesgo. El ensayo de Org 10172 en el tratamiento del ictus agudo (**TOAST** por sus siglas en inglés -Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment-), descrito en 1993, proporciona un sistema

de clasificación que estratifica este tipo de ictus en cinco subtipos diferentes [16], lo que ayuda a comprender y categorizar sus causas.

1. **Aterosclerosis de grandes vasos:** La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de desechos celulares, calcio y otras sustancias en el revestimiento interno de las arterias, lo que provoca la formación de placas que suelen afectar a las arterias grandes y medianas, provocando su estrechamiento. Además, esta formación de placa puede provocar la oclusión de una arteria vertebral, que suministra sangre al cerebro, o la formación de un coágulo. Si este coágulo obstruye el flujo sanguíneo al cerebro puede producirse un derrame cerebral, un ictus o un ataque isquémico transitorio. Las lesiones ateroscleróticas de las grandes arterias están proximales al territorio vascular [17].

Esta condición es responsable de aproximadamente entre el 30% y el 43% de todos los ictus isquémicos [18]. Hay dos tipos de ictus isquémicos causados por placa aterosclerótica:

- **Ictus aterotrombótico:** Iniciado por la formación de un coágulo de sangre dentro de la pared de una arteria [17].
- **Ictus embólico:** Ocurre cuando se forma un coágulo de sangre en un lugar alejado de la obstrucción, generalmente en el corazón o en las arterias grandes del cuello [17].

Según los hallazgos clínicos y anatómicos, los pacientes que presentan una aterosclerosis de grandes arterias se pueden clasificar en cuatro diferentes escenarios: Estenosis carotídea extracraneal asintomática y sintomática, enfermedad vertebrobasilar aterosclerótica y aterosclerosis intracraneal [19].

Finalmente, para diagnosticar un ictus aterotrombótico, debe haber estenosis u oclusión mayor al 50% de una arteria cerebral/cortical principal, presumiblemente debido a aterosclerosis, demostrada mediante diversas técnicas de imagen. Además, los infartos deben ser mayores de 15 mm y afectar el cerebelo, el tronco del encéfalo, la corteza y las regiones subcorticales [18].

2. **Ictus cardioembólico:** Los ictus cardioembólicos representan entre el 20 % y el 30 % de todos los ictus isquémicos. Este tipo se caracteriza por la presencia de una posible embolia intracardíaca en ausencia de enfermedad arterial, lo que representa la base del diagnóstico clínico [18].

La embolia formada en el corazón que viaja al cerebro puede ocurrir de tres maneras diferentes:

1. Paso anormal de la circulación venosa a la arterial.
2. Se formaron trombos en una cámara cardíaca izquierda agrandada y en estasis sanguíneo.
3. Liberación de material de una superficie valvular anormal.

En el diagnóstico de esta clasificación de ictus, generalmente los patrones de tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM) implican una lesión en un territorio cortical [20]. La que se ve acompañada por el estudio de los factores de riesgo, de los cuales los más comunes para este tipo de ictus incluyen la edad, la hipertensión, la diabetes mellitus, el tabaquismo y la fibrilación auricular (FA), siendo esta última la patología cardíaca más frecuente entre los infartos

cardioembólicos. Por lo que, la FA es el factor de riesgo más estudiado relacionado con el ictus cardioembólico [20].

Estudiar este tipo de ictus es crucial ya que la embolia cardíaca provoca los ictus más graves en comparación con otros subtipos. Finalmente, como método de prevención secundaria se ha sugerido que el tratamiento con anticoagulantes orales puede prevenir hasta el 70% de los ictus en pacientes con FA [21].

3. **Arterio-oclusión pequeña (infarto lacunar):** El ictus lacunar resulta de la oclusión de pequeñas arterias en el cerebro debido a patologías como microateromas y lipohialinosis. Estas lesiones suelen medir menos de 15 milímetros de diámetro y se localizan en la zona subcortical [22]. Los ictus lacunares representan entre 25% y el 30% de los ictus isquémicos y son una de las principales causas de deterioro cognitivo y discapacidad, especialmente en pacientes con edad avanzada e hipertensión [18].

En esta clasificación, los síntomas clínicos del infarto cerebral generalmente se desarrollan con la aparición de la hipertensión o durante períodos de aumento de los valores de presión arterial. El infarto pequeño y profundo es la base estructural del ictus lacunar, esta se asocia hasta en un 45% de los casos con demencia y en un 30% de los casos con discapacidad moderada-severa en su evolución [23].

En cuanto al diagnóstico, el método utilizado por excelencia es la RM con imágenes potenciadas en difusión. Sin embargo, debido al alto costo y la limitada disponibilidad de esta prueba de imagen, TC se utiliza como alternativa. A pesar de esto, la TC no es tan sensible como

la RM, por lo que el diagnóstico de este tipo de ictus sigue representando un desafío para la práctica clínica [24].

4. **Ictus de causas inusuales:** Alrededor del 11 % de los ictus isquémicos se deben a enfermedades raras. Esta categoría incluye pacientes con causas poco comunes del ictus, y los AIT a menudo se atribuyen a dichas causas [18]. Se sabe poco sobre este tipo de ictus, ya que rara vez se ha informado de su etiología o características clínicas. Sin embargo, es de suma importancia reconocer la causa atípica que ha llevado a la aparición del ictus, ya que esto tiene importantes implicaciones en el manejo y tratamiento del mismo. Los trastornos comunes en esta categoría incluyen vasculopatías no ateroscleróticas y estados de hipercoagulabilidad o enfermedades hematológicas [25].
  
5. **Ictus de etiología indeterminada:** En muchos casos, la causa de un ictus no se puede determinar con certeza. Por lo tanto, esta última categoría engloba a todos los pacientes que, a pesar de una evaluación exhaustiva, no tienen una causa determinada o por el contrario presentan múltiples causas. En algunas ocasiones las causas pueden pasar desapercibidas, especialmente aquellas que requieren un estudio cardiológico detallado, como es el caso de la fibrilación auricular paroxística.

## 1.2. Ataque isquémico transitorio

### 1.2.1 Descripción y manifestación clínica

Como hemos ido mencionando a lo largo de los capítulos anteriores, el AIT es un evento vascular caracterizado por una duración corta y una mejoría

espontánea. Este evento vascular, ocurre cuando el flujo sanguíneo que va a una parte del cerebro se bloquea o disminuye brevemente, lo que lleva al inicio de la cascada isquémica sin que resulte en un infarto agudo visible. Este trastorno neurológico se acompaña de alteraciones globales o focales en la función cerebral que regularmente duran menos de 24 horas. El AIT se considera una de las emergencias neurológicas más comunes debido a la mayor incidencia de ictus después de un episodio de AIT [26] [27]. Por lo tanto, este evento neurológico sigue representando un importante problema de salud pública, con una prevalencia de aproximadamente 50 por 100.000 personas por año [4].

En el registro de ictus de Lausana se indicó que alrededor de la década de 1990 la prevalencia de AIT antes del ictus podía llegar al 40% [28]. Esta cifra aumentaba al 50% si sólo se tenía en cuenta el ictus aterotrombótico [29]. Hoy en día, estas cifras se han reducido considerablemente debido al mejor manejo de varios factores de riesgo y de los AIT, así mismo los avances tecnológicos han impactado directamente en la atención médica, haciendo esta más eficiente y mejorando el diagnóstico clínico. Por otra parte, la prevalencia de ictus recurrentes después de un episodio de AIT, dentro de los 90 días posteriores al inicio de los síntomas, es actualmente del 10% y aproximadamente la mitad de estos ocurren dentro de las primeras 24 horas. Se ha indicado que hasta el 80% de los ictus después de un AIT podrían prevenirse, lo que destaca la importancia de un diagnóstico preciso y un tratamiento temprano [30] [31].

Por otro lado, se ha informado que la incidencia de AIT en Europa es de 0,5 a 2,4 por 1.000 personas en una población de 55 a 64 años. Se ha observado un aumento exponencial de la incidencia a medida que avanza la edad; ya que entre los 75 y 84 años, la incidencia asciende a 3,0 a 7,2 y de 2,2 a 8,1 por 1.000, respectivamente [32].

La tasa de incidencia ajustada por edad en España es de 29 por 100.000 y la proporción estimada de población que sufrió un AIT es del 1,3%. Dado el envejecimiento de la población, es previsible que la incidencia de este aumente en los próximos años. En España y otros países europeos, las guías nacionales de ictus cubren el tratamiento del AIT y existen sistemas específicos para su atención. Algunos estudios han informado sobre un impacto positivo en el período de hospitalización y tratamiento del AIT [33] [34]. Por ejemplo, en el 2009 se publicó un estudio epidemiológico denominado IBERICTUS, el cual reveló una tasa bruta de AIT de 0,37 por 1.000 habitantes al año para el 2006 solo en España. Entre los 530 casos de AIT registrados en el estudio, se produjo una sola muerte durante la estancia hospitalaria [35].

Como se mencionó anteriormente, el AIT es un evento de corta duración. Por lo regular en estos eventos transitorios, los síntomas suelen durar menos de una hora, y sólo en algunos casos persisten hasta 24 horas. Los síntomas principales son los que se resumen en las siglas FAST (mencionadas en el capítulo uno). Estos síntomas incluyen debilidad motora, defectos del campo visual y trastornos del habla, como afasia y disartria. Otros síntomas menos comunes pueden incluir parálisis completa de uno o ambos lados del cuerpo, vértigo, mareos, problemas de coordinación y equilibrio, y disfagia (dificultad para tragar) [36]. Las manifestaciones clínicas más comunes y poco comunes se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2** Manifestaciones clínicas más y menos comunes de un AIT, divididas en tipos de síntomas y características de los mismos.

	<b>AIT común</b>	<b>AIT poco común</b>
<b>Tipos de síntomas</b>	Debilidad o torpeza de un lado de la cara o del cuerpo.	Parálisis completa de uno o ambos lados del

		cuerpo. Debilidad o torpeza bilateral.
	Habla confusa o confusa con la conciencia clara. Afasia.	Problemas del habla. Habla arrastrada y lenta que podría representar AIT con disfasia.
	Pérdida repentina del lenguaje. Es posible que no pueda hablar en absoluto.	Problemas de memoria. Síntomas de vértigo (náuseas, inestabilidad, etc.) o desmayos.
<b>Características de estos síntomas.</b>	Pérdida focal espontánea y repentina de la función neurológica.	Inicio progresivo
	Presencia de factores de riesgo vascular.	Progresión y evolución de los síntomas (cambios graduales).
	Resolución completa de los síntomas en 24 horas o menos.	Disestesias destacadas

Los factores de riesgo más comunes en el AIT son similares a los del ictus isquémico agudo. Entre estos encontramos la edad, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, el tabaquismo, el consumo de alcohol, el desequilibrio del perfil lipídico, los antecedentes de eventos vasculares (personales y/o familiares) y la predisposición genética [37].

El riesgo de sufrir un ictus después de un AIT está influenciado por varios factores. Estos incluyen antecedentes de múltiples episodios de AIT en dos

semanas, la presencia de síntomas corticales como afasia, negligencia y hemianopsia, déficits motores, hipertensión, entre otros [32].

Es fundamental reconocer todos estos factores de riesgo tanto en la prevención como en el tratamiento, ya que esto permite una intervención adecuada y puede disminuir drásticamente la probabilidad de sufrir otro ictus en el futuro. El control de la hipertensión y la glucemia en los diabéticos, dejar de fumar, reducir el consumo de alcohol, así como los cambios en el estilo de vida, ayudan a minimizar el riesgo general de padecer un ictus. Del mismo modo, algunos estudios sugieren que la detección y el manejo de los perfiles lipídicos son muy útiles para la reducción del riesgo de sufrir un ictus [38] [39]. En resumen, el AIT se considera un predictor clínico de eventos vasculares graves, lo que hace que el diagnóstico correcto de este evento vascular transitorio sea una oportunidad para la prevención secundaria.

### 1.2.2 Diagnóstico AIT

La evaluación inicial de un AIT es de suma importancia ya que ayuda a determinar el tratamiento adecuado. Además, ayuda a establecer el tipo de seguimiento del paciente como medida de prevención secundaria.

Como regla general la evaluación inicial se da por parte del médico de atención primaria, la cual habitualmente se realiza dentro de las 24 horas posteriores al inicio de los síntomas. Si después de esta primera evaluación, se tiene sospecha de un ictus agudo o AIT, se deriva al paciente a un especialista para determinar la causa del evento vascular (aterosclerótico, cardioembólico, lacunar, causa indeterminada, causa rara) [40] [16]. Además de la clasificación TOAST clásica (descrita anteriormente), los AIT se pueden clasificar según las manifestaciones clínicas y el territorio vascular afectado, como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3** Clasificación del AIT según la manifestación clínica y territorio vascular afectado.

<b>Manifestación clínica</b>	Subcortical  Atípico  Cortical hemisférica  De retina
<b>Territorio vascular</b>	Carótida  Vértebro -basilar  Ubicación indeterminada

Dado que el AIT es un evento de corta duración, es decir que los síntomas desaparecen en menos de una hora [41], muchos de ellos a veces desaparecen durante la evaluación, lo que complica el diagnóstico preciso para el especialista en ictus o neurólogo. Entre las pruebas que se realizan para determinar el diagnóstico clínico se encuentran: Medición de la presión arterial, hemograma (para comprobar si hay colesterol alto o diabetes), electrocardiograma o holter (para evaluar la regularidad de los latidos del corazón), ecografía carotídea y transcraneal (para evaluar el estrechamiento o bloqueo de las arterias del cuello que van al cerebro y/o las del cerebro), y finalmente la neuroimagen cerebral (TAC/MRI), aunque no siempre son necesarios, este tipo de pruebas solo suelen emplearse cuando la parte del cerebro afectada no está clara.

Pese a que el diagnóstico del AIT es de gran importancia, en la actualidad no se cuenta con una definición clara de esta patología. Una de las primeras definiciones de este evento transitorio fue postulada en 1958 por el Instituto

Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés -National Intutite of Health-), sugiriendo que los síntomas de AIT suelen durar desde varios segundos hasta minutos, con algunas excepciones que duran varias horas [42]. Sin embargo, en 1975, el mismo NIH estableció un límite de 24 horas para diferenciar el AIT del infarto cerebral o ictus.

Por otra parte, el AIT es definido por la Sociedad Española de Neurología como un episodio de disfunción cerebral focal o monocular con síntomas de menos de 24 horas de duración, causado por insuficiencia vascular por trombosis o embolia arterial asociada a enfermedad arterial, cardíaca o hematológica [25]. Sin embargo, este período de 24 horas se considera arbitrario, ya que la mayoría de los TIA en realidad duran menos de una hora, normalmente menos de 10 minutos. A pesar de esta breve duración, el diagnóstico de AIT no debe dar una falsa impresión de levedad [43].

A pesar de que las anteriores definiciones ayudaron a establecer un límite temporal de este evento y lograron mejorar en gran medida el diagnóstico del AIT y la detección de los mismos, los avances en tecnología, estudios epidemiológicos y exploraciones de neurodiagnóstico han demostrado la necesidad de un cambio en la definición de AIT. Aunque el AIT y el infarto cerebral isquémico comparten el mismo sustrato fisiopatológico, el AIT, al ser un evento transitorio que se resuelve por sí solo, no debería dejar evidencia de lesión cerebral, mientras que el ictus isquémico sí.

Gracias al avance tecnológico que se ha tenido durante los últimos años, los estudios de neuroimagen sensibles al daño tisular han demostrado que entre el 4% y el 20% de los pacientes clasificados inicialmente como AIT (usando la definición de 24 horas), presentan un infarto en el territorio vascular, y hasta el 50% presentan anomalías en las secuencias de difusión [44] [45].

En 2002, después de recopilar evidencia relacionada con la evolución de la definición y las características clínicas de este evento transitorio, el grupo de trabajo de AIT propuso la siguiente definición: "*Un breve episodio de déficit neurológico causado por isquemia focal o retiniana, cuyos síntomas clínicos típicamente se resuelven en menos de una hora, y sin aparente infarto agudo*" [46].

Un desafío importante en el diagnóstico preciso del AIT es que la definición establecida fue establecida antes de la era de las imágenes avanzadas. Inicialmente se basaba en el tiempo, con una limitación temporal de 24 horas. Posteriormente, los avances en los estudios de imagen han revelado lesiones cerebrales asociadas a AIT con síntomas prolongados [47]. Por lo tanto, recientemente se ha propuesto que la definición debería centrarse en los síntomas transitorios sin lesiones isquémicas en las imágenes cerebrales, sin ignorar la duración de los síntomas, que normalmente duran menos de una hora. Actualmente se ha aceptado como válido el propuesto por la American Heart Association (AHA): "*un episodio transitorio de disfunción neurológica causado por isquemia cerebral, espinal o retiniana focal, sin infarto agudo*" [48] [49].

Con el tiempo, la variación en la definición de AIT ha complicado su diagnóstico preciso. Además, la alta prevalencia de trastornos que presentan síntomas similares a los de un AIT suele generar confusión. A estos simuladores se conocen como "*mimics*", y se ha indicado que su prevalencia varía entre el 20% y el 50 % de los casos de sospecha de los ictus isquémicos; presentándose mayormente en mujeres [50] [51]. Entre los trastornos neurológicos más comunes en el grupo de los *mimics*, se encuentran la epilepsia, los trastornos por conversión, la migraña, los tumores y la hipoglicemia [52] [53]. Por otra parte, los pacientes más susceptibles a estos

*mimics* suelen ser más jóvenes, tener presión arterial baja y una puntuación en el NIHSS menor que la de un ictus establecido. Asimismo los síntomas de estos trastornos suelen tener un comienzo gradual, con una severidad que fluctúa en el tiempo [50] [54].

Diferenciar entre estas condiciones (AIT vs *Mimics*) es extremadamente desafiante, ya que el estándar de oro para un diagnóstico preciso sigue siendo la evaluación clínica temprana por parte de un experto clínico. Esta evaluación se basa principalmente en la historia del paciente y la interpretación del experto. Ante la necesidad de revisar la interpretación de la historia clínica, se han propuesto como alternativa los estudios de imagen, aunque estos son recursos limitados en muchos centros de urgencia y prácticamente inaccesibles en otros casos [50].

A pesar de los avances en la definición de AIT, el diagnóstico sigue siendo un desafío para los médicos. En este sentido, los biomarcadores sanguíneos se perfilan como una herramienta potencial para mejorar el diagnóstico, la estratificación del riesgo y el tratamiento individual, no solo del ictus agudo, sino también de los ictus menores y AIT [55].

### 1.3. Biomarcadores sanguíneos

#### 1.3.1 Aspectos básicos

Un biomarcador es una sustancia medible que se encuentra en el cuerpo, como una molécula, un gen o una característica natural que permite la detección de un proceso patológico o fisiológico específico. Como el marcador es una característica medible, este puede evaluarse objetivamente como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta a un tratamiento médico o terapéutico [56].

Los biomarcadores pueden medirse o descubrirse utilizando diversas metodologías, como tecnología ómica (genómica, proteómica, metabolómica y lipidómica), entre otras.

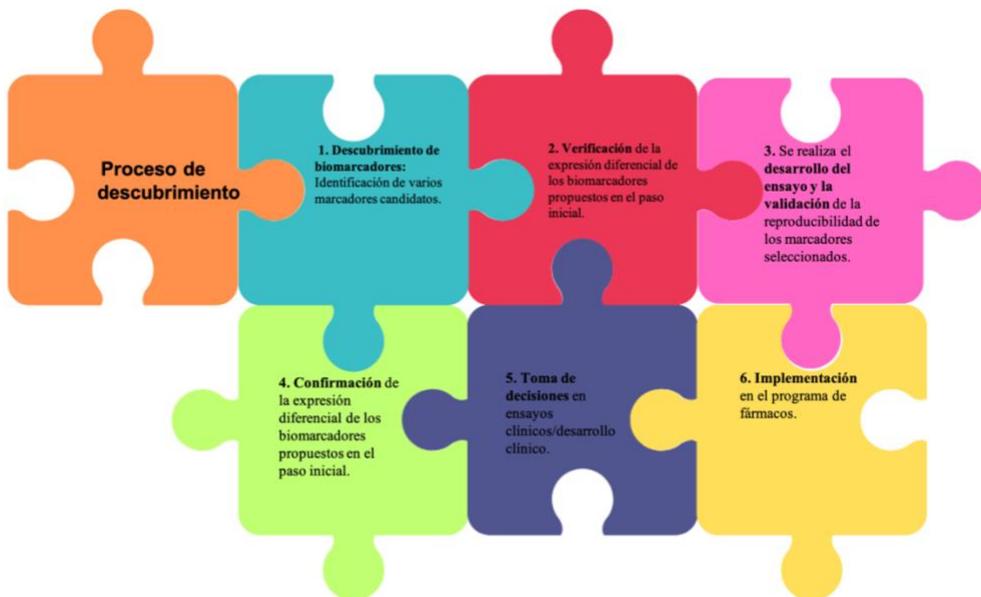
A lo largo de los años, se han presentado varios marcadores como candidatos para el diagnóstico y la predicción del ictus [57]. Sin embargo, la mayoría de los estudios han revelado varias deficiencias, en particular por el pequeño tamaño muestral. Por tanto, los marcadores propuestos hasta ahora no se han trasladado a la práctica médica.

A pesar de estos desafíos, se han identificado algunos biomarcadores prometedores que podrían mejorar significativamente el diagnóstico y el tratamiento del ictus. Por ejemplo, la antitrombina III (ATIII), el fibrinógeno y la albúmina modificada por isquemia muestran potencial para fines diagnósticos. Del mismo modo, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y el microARN 124-3p se han propuesto para distinguir entre ictus isquémico y hemorrágico [58].

Descubrir el “marcador perfecto” implica varios pasos. Generalmente, este proceso comienza con un análisis masivo de resultados analíticos y/o de pruebas en una pequeña muestra de población. A esto le sigue una prueba de concepto, que conduce a un análisis final el cual implica una reducción de análisis en una población más grande.

Específicamente en el caso de biofluidos como sangre u orina, el desarrollo y descubrimiento de biomarcadores implican primero la identificación de varios marcadores candidatos que a menudo están estrechamente asociados con un proceso biológico específico. El siguiente paso es la confirmación o

verificación de la expresión diferencial de los biomarcadores propuestos en el paso inicial (en el caso de los genes). Posteriormente, se realiza el desarrollo del ensayo y la validación de la reproducibilidad de los marcadores seleccionados. Finalmente, los marcadores que generan características comunes, en los que ya se ha establecido sensibilidad y especificidad, pasan a la siguiente fase que es la toma de decisiones en los ensayos clínicos. En este último paso, los marcadores se cuantifican y en algunos casos se utilizan en programas de desarrollo de fármacos [59] [60] (Figura 3).



**Figura 3** Pasos en el descubrimiento de biomarcadores.

Aunque existen varias técnicas para medir una proteína, como la micropolaridad de fluidos, la inmunofluorescencia, los inmunoensayos, etc., en la actualidad no existe ninguna técnica específica que pueda medir de forma rápida y eficiente diversos marcadores. Lo que representa uno de los principales problemas prácticos para la mayoría de los biomarcadores. Sin embargo, las pruebas en el punto de atención (POCT) ofrecen una alternativa rentable y eficiente para la medición de estas proteínas en la práctica clínica.

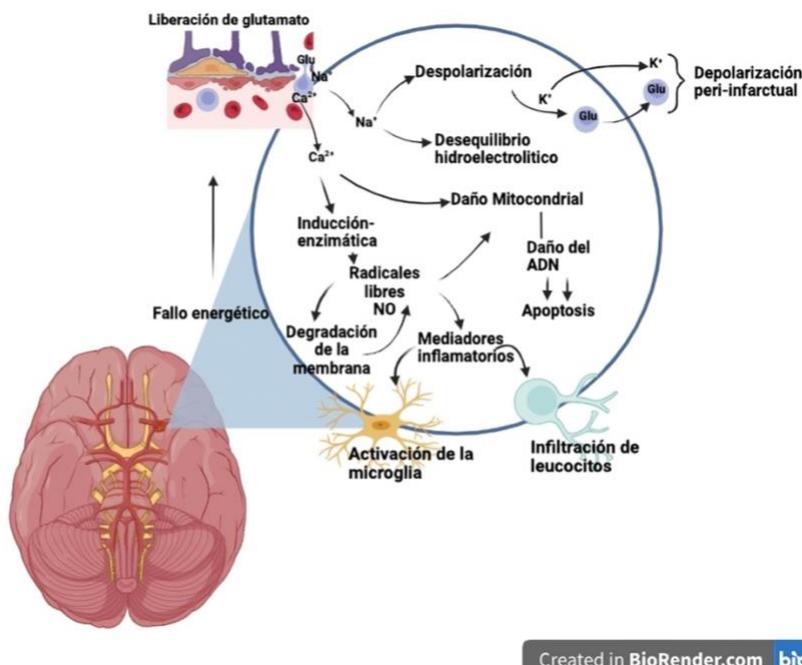
El POCT es una prueba de laboratorio clínico que se realiza cerca del lugar de atención al paciente y proporciona resultados rápidos. Este rápido proceso permite al personal de atención médica implementar tratamientos adecuados con prontitud, lo que conduce a mejores resultados clínicos y económicos en comparación con las pruebas de laboratorio tradicionales. Los avances tecnológicos, como la miniaturización de la electrónica y la mejora de la instrumentación, han revolucionado el POCT, permitiendo el desarrollo de dispositivos más pequeños y precisos. Este pequeño dispositivo puede ser utilizado por varios profesionales sanitarios y, en algunos casos, incluso por los propios pacientes [61].

Sin embargo, a pesar de los beneficios mencionados la mayoría de estos dispositivos están diseñados para medir una molécula específica y su implementación en la práctica clínica se ha retrasado por múltiples razones [62].

### 1.3.2 Biomarcadores y diagnóstico de AIT

En los últimos años, numerosas disciplinas médicas han utilizado cada vez más biomarcadores sanguíneos [63] [64]. En el caso del campo neurovascular, la investigación se ha centrado predominantemente en el ictus agudo, especialmente el ictus isquémico. En este sentido contar con biomarcadores con alta especificidad para la isquemia cerebral sería muy beneficioso para el diagnóstico de AIT o ictus establecidos, lo que conduciría a tratamientos más precisos y oportunos. Por el contrario, los biomarcadores con alta sensibilidad podrían ayudar a descartar otras afecciones que imitan la isquemia cerebral, reduciendo la probabilidad de diagnósticos erróneos y garantizando que cada paciente reciba la atención más adecuada.

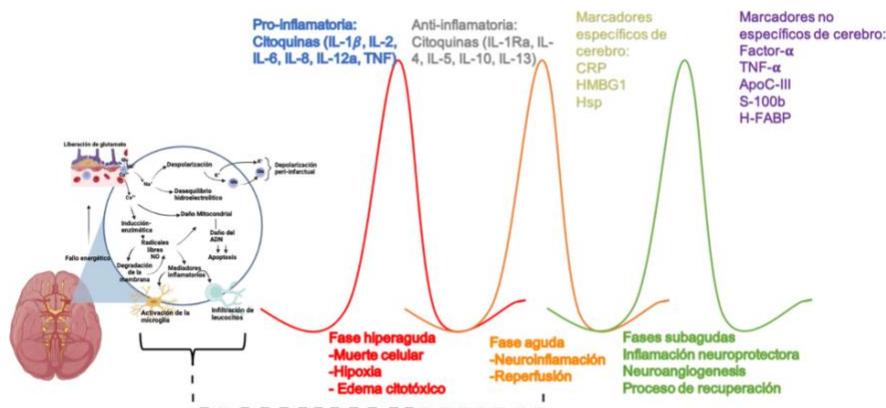
Específicamente, los marcadores que se han propuesto para los ictus isquémicos están estrechamente relacionados con el proceso de la cascada isquémica. Recordemos que, al igual que en ictus isquémico, en el AIT hay un cese del flujo sanguíneo que altera el equilibrio de la unidad neurovascular y la autorregulación cerebral. A partir de esto se inician las primeras fases, en el cual se generan diversos metabolitos en el cerebro, que cruzan la barrera hematoencefálica y entran al torrente sanguíneo, activando el sistema inmunológico y produciendo anticuerpos. El inicio de esta cascada implica que se desencadenen otros fenómenos, como la inflamación, la apoptosis o el estrés oxidativo, que contribuyen al daño causado por la isquemia cerebral [65] (Figura 4).



Created in BioRender.com

**Figura 4** Principales procesos de la cascada isquémica. Figura adaptada de Endres et al. (2008). [65] Creado con BioRender.com.

La principal dificultad para utilizar marcadores o proteínas en el diagnóstico de AIT es que la mayoría de estos procesos ocurren dentro de los primeros minutos u horas después de la oclusión vascular (fase hiperaguda), lo que dificulta su detección en la práctica clínica. Sin embargo, los fenómenos posteriores juegan un papel fundamental en la isquemia cerebral y pueden convertirse en fuente del biomarcador (Fase aguda y subaguda). En consecuencia, muchos estudios se han centrado en identificar marcadores relacionados con estos procesos posteriores, como inflamación, apoptosis, etc. Asimismo, se han investigado diferentes marcadores proteicos de origen no cerebral por su potencial utilidad en el diagnóstico de ictus o AIT. Los ejemplos incluyen apolipoproteínas, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), proteína C reactiva (PCR), S-100b y del factor von-Willebrand (vWF) [57] [66] (Figura 5).



**Figura 5** Cronología de las diferentes fases fisiopatológicas del ictus y biomarcadores relacionados con este evento vascular. Parcialmente creado con BioRender.com.

Aunque la mayoría de estos estudios se han centrado en el ictus isquémico, los mismos marcadores propuestos podrían usarse para identificar el AIT en un

futuro. Esta propuesta se basa en el conocimiento de la investigación de la isquemia cardíaca y el uso de la troponina como marcador.

Como sabemos, la troponina es una proteína específica del daño cardíaco que normalmente no se detecta en la sangre. Sin embargo, esta molécula está elevada y puede detectarse cuando hay daño en el músculo cardíaco. Por lo que se ha sugerido que los niveles de esta proteína se correlacionan positivamente con la extensión del daño cardíaco. Con lo cual, la medición de esta molécula se utiliza para diferenciar los diferentes tipos de eventos cardíacos, como angina inestable (isquemia sin elevación de troponina), no STEMI (por sus siglas en inglés -no ST-elevation myocardial infarction-) y STEMI (por sus siglas en inglés -ST-elevation myocardial infarction-) [67] [68]. Con los avances en la medición de los marcadores se pretende identificar una proteína específica para las lesiones vasculares, similar a la troponina para las lesiones cardíacas.

La investigación sobre biomarcadores de lesión isquémica aguda neuronal ha identificado varias herramientas de diagnóstico prometedoras que pueden distinguir el AIT de otros ictus. Se ha prestado especial atención a los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), que desempeñan un papel crucial en la transmisión sináptica y la plasticidad [69] [70]. Después de la isquemia cerebral se ha reportado que la expresión de los niveles plasmáticos de autoanticuerpos contra las subunidades NR2A/2B se encuentran elevados en pacientes con AIT e ictus isquémico aunque estos datos nunca se han replicado por grupos independientes [71].

Otro biomarcador notable para el diagnóstico temprano incluye la proteína DJ-1 y el nucleótido difosfato quinasa A (NDKA-por sus siglas en inglés). DJ-1,

codificado por el gen PARK7, es conocido por su papel en la protección de las células cerebrales del estrés oxidativo. Por otro lado, los niveles de NDKA aumentan en el líquido cefalorraquídeo (LCR) después de eventos isquémicos. La proteína de degradación de fusión de ubiquitina 1 (UFD1), la proteína básica de mielina (MBP), la proteína de unión a ácidos grasos del corazón (H-FABP), UFD1, el péptido NR y el péptido NR2 también son biomarcadores importantes. Sin embargo, su implementación en la práctica clínica requiere aun de más investigación [71] [72].

Por otro lado, se han propuesto los biomarcadores relacionados con la coagulación y la inflamación para evaluar el riesgo de ictus. Se ha observado que los niveles elevados de fibrinógeno están relacionados con ictus isquémicos recurrentes, mientras que los niveles elevados del factor von Willebrand (vWF) se correlacionan con ictus severos y malos resultados clínicos [73]. Asimismo, se ha demostrado que los marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) y el ligando CD40 soluble (sCD40L), se correlaciona con el ictus recurrente y los malos resultados en pacientes con AIT [71] [74]. Del mismo modo, las citocinas inflamatorias y los biomarcadores como la copeptina, un marcador sustituto de la arginina vasopresina (AVP), se ha relacionado con el pronóstico para predecir el riesgo de ictus en pacientes con AIT, especialmente cuando se integran con puntuaciones de riesgo existentes como la puntuación ABCD2 [75].

Finalmente, la identificación y validación de biomarcadores específicos para AIT tiene un gran potencial para mejorar la precisión del diagnóstico y los resultados de los pacientes. La investigación continua y los avances en proteómica y biología molecular son esenciales para integrar estos

biomarcadores en la práctica clínica habitual, mejorando el manejo y el tratamiento de los AIT e ictus. Dado el alto riesgo de recurrencia después de un AIT, la evaluación diagnóstica temprana y el manejo terapéutico son cruciales. Las escalas de riesgo como la ABCD y sus variantes podrían mejorarse incorporando biomarcadores, optimizando su precisión a la hora de estratificar el riesgo. Esta integración permitiría una evaluación más precisa de la condición del paciente, lo que conduciría a mejorar los tratamientos y los resultados a largo plazo.

## OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

**General:**

1. Determinar biomarcadores sanguíneos para mejorar el diagnóstico del AIT.

**Específicos:**

1. Evaluar el papel de H-FABP como marcador para identificar lesiones isquémicas determinadas mediante resonancia, resultados de neuroimagen positivos (MRI-DWI positivo) vs negativos (MRI-DWI negativo), en pacientes diagnosticados con AIT.
2. Evaluar el papel de H-FABP como marcador para el diagnóstico preciso de AIT frente a un evento que simula un ictus.
3. Evaluar un panel de biomarcadores para el diagnóstico precoz del AIT.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para lograr los objetivos descritos anteriormente, esta tesis doctoral utiliza muestras de sangre de dos cohortes diferentes. A continuación, se muestra una descripción de estas cohortes y las técnicas utilizadas para medir las muestras en cada estudio.

### 3.1 Colección de muestras

El objetivo de este estudio fue determinar las diferencias en el riesgo de nuevos episodios isquémicos entre pacientes con AIT, considerando datos temporales y de neuroimagen junto con los hallazgos ecográficos. El estudio incluyó pacientes con AIT que fueron atendidos dentro de las primeras 24 horas por un neurólogo en el departamento de emergencias. Los pacientes se sometieron a una resonancia magnética como parte del protocolo del estudio dentro de los 7 días posteriores al inicio de los síntomas. Para nuestro subestudio se trabajó con un total de 91 participantes. De estos, se detectó lesión tisular (DWI positivo) en 18 pacientes, mientras que los 73 participantes restantes obtuvieron un resultado negativo (DWI negativo).

Los *criterios de inclusión* fueron los siguientes:

- Edad >18 años.
- Diagnóstico de AIT.
- Realización de una prueba de neuroimagen dentro de las 24 horas siguientes al inicio de los síntomas clínicos.

Los *criterios de exclusión* fueron los siguientes:

- Diagnóstico diferencial (causas de déficit cerebral transitorio de menos de 24 horas que simulan un verdadero AIT).
- Incapacidad para obtener muestras de sangre.

### ***Protocolo de resonancia magnética***

La resonancia magnética se realizó antes de un nuevo ictus de seguimiento. Todos los casos se estudiaron inicialmente con TC sin contraste para excluir a los pacientes que presentaban una lesión isquémica. Para las imágenes por resonancia magnética se utilizó un sistema de adquisición de imágenes de cuerpo entero de 1,5 T con un gradiente de 24 mT /m, un tiempo de subida de 300 ms y un receptor con capacidad de ecoplanar equipado con una sobremarcha de gradiente (Magnetom Vision Plus; Siemens Medical Systems). Además, se utilizó una secuencia de pulso plano-eco-espín-eco de un solo disparo con valores b de gradiente de difusión de 0, 500 y 1000 seg/mm a lo largo de los 3 ejes ortogonales en 15 secciones axiales, utilizando secciones de 5 mm de espesor, un espacio entre cortes de 1,5 mm, y un campo de visión de 230 mm, y matriz 96 128. El tiempo de adquisición fue de 56 segundos. La anomalía del tejido se definió como áreas de alta intensidad de señal en DWI isotrópico (disminución del movimiento del agua) que reflejan una lesión isquémica aguda, considerada como DWI positiva. Si no había pruebas de daños, se consideraba un DWI negativo [76].

### **3.2 Panel de biomarcadores**

El estudio StrokeChip fue un estudio prospectivo, observacional y multicéntrico realizado en seis hospitales diferentes de Cataluña entre agosto de 2012 y noviembre de 2013. El estudio originalmente incluyó a sujetos que presentaban sospecha de ictus agudo, determinado por el médico tratante en las 6 horas siguientes al inicio de los síntomas.

Los *criterios de inclusión* fueron los siguientes:

- Edad >18 años.
- Sospecha de ictus en la primera valoración médica con síntomas persistentes a la llegada a urgencias.
- Toma de muestras de sangre dentro de las 6 horas posteriores al inicio de los síntomas.
- Extracción de sangre antes del tratamiento trombolítico.
- Consentimiento informado firmado.

*\*En los casos en los que no se determinó el momento de aparición del ictus, se consideró el momento de aparición la última vez que se supo que el paciente estaba asintomático.*

Los *criterios de exclusión* fueron los siguientes:

- Incapacidad para obtener muestras de sangre.
- Pacientes que no pudieron recibir un diagnóstico preciso dentro del mes posterior al evento.

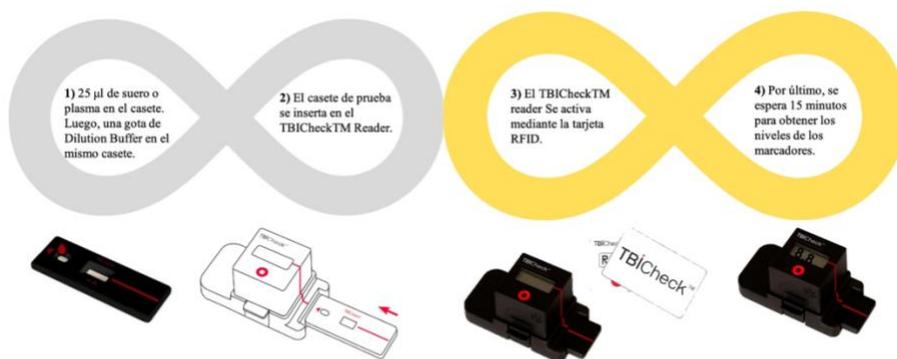
En el estudio original se incluyeron un total de 1.307 pacientes, abarcando casos de ictus isquémicos, hemorrágicos y mímicos. Para el primer objetivo, se trabajó con un total con 103 pacientes AIT y 131 con *Mimics*. Para el segundo objetivo, se compararon 131 casos de AIT con 44 casos de *Mimics*.

### 3.3 Medición de biomarcadores

En ambos estudios la sangre se recogió en tubos de suero y plasma en el momento de la inclusión, se centrifugó a 1.500 g a 4 °C durante 15 min y se congelaron alícuotas de suero y plasma a -80 °C hasta la determinación del biomarcador.

### 3.3.1 POCT

Para evaluar H-FABP como marcador para el diagnóstico preciso de AIT (comparando AIT frente a *Mimic* y DWI positivo frente a DWI negativo), se utilizó un sistema de POCT. Los niveles séricos de esta proteína se determinaron mediante una prueba rápida (TBICheck™, ABCDx SA, Suiza). Esta es una prueba inmunocromatográfica que permite la determinación cuantitativa de H-FABP en sangre total, suero o plasma en 15 minutos, proporcionando la concentración de H-FABP en ng/ml. Primero se colocan 25 µl de suero y una gota de diluyente (del mismo kit) en la tira reactiva, para luego introducirla en el Cube Reader según las instrucciones del fabricante (Figura 6).



**Figura 6** Representación del procedimiento de medición de H-FABP con el POCT

### 3.3.2 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA):

En aras de cumplir con el primer objetivo se utilizaron diferentes inmunoensayos para evaluar un panel de biomarcadores. Del total de proteínas medidas en el estudio original, para este subestudio se seleccionaron ocho

biomarcadores que incluyeron: apolipoproteína CIII (ApoC-III), dímero D, endostatina, oncogén  $\alpha$  relacionado con el crecimiento (GROA), interleucina-6 (IL6), N-terminal péptido natriurético pro-tipo B (NT- proBNP), proteína de adhesión vascular-1 (VAP1), factor von Willebrand (vWF) [77]. Los diferentes inmunoensayos que se realizaron se enumeran en la Tabla 4.

**Tabla 4** Métodos de medición de biomarcadores, material, dilución y unidades.

Biomarcador	Fabricante	Referencia	Dilución	LLOQ	Unidades
<b>ApoCIII</b>	abnova	KA0465	1/2500	0.002	$\mu\text{g/mL}$
<b>Dímero D</b>	estago	947	1/42	10	$\text{ng/mL}$
<b>endostatina</b>	I+D	RYD-DNST0	1/50	0.023	$\text{ng/mL}$
<b>GroA</b>	Ausón 3-plex	85.723	1/2	0,39	$\text{pg /mL}$
<b>IL6</b>	Ausón 3-plex	85.723	1/2	0,20	$\text{pg /mL}$
<b>NTPROBNP</b>	roche	4.842.464	1/1	5	$\text{pg /mL}$
<b>VAP1</b>	eBiociencia	BMS259TEN	1/1000	0.019	$\text{ng/mL}$
<b>FvW</b>	estago	942	1/102	1	%

LLOQ: límite inferior de cuantificación; ApoCIII: apolipoproteína CIII; GroA: oncogén alfa relacionado con el crecimiento; IL-6: interleucina-6; NTproBNP: propéptido natriurético tipo B N-terminal; VAP-1: proteína de adhesión vascular-1; vWF: von Willebrand factor.

Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante. Además, las muestras de plasma se analizaron por duplicado y el coeficiente

de variación medio intraensayo fue <20%. La variación entre ensayos se determinó analizando 2 veces en cada placa un control interno comercial (suero humano tipo AB, masculino, coagulación, Sigma-Aldrich, n.º de cat. H6914). Todas las proteínas medidas tienen un coeficiente de variación entre ensayos <20%.

### 3.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con R versión 4.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria). De manera general el protocolo para el análisis estadístico fue similar en ambos estudios. En primer lugar, se comprobó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov -Smirnov. Y a partir de esto se aplicó el test indicado en cada caso. Para el análisis univariante, se utilizó la prueba  $U$  de Mann-Whitney o la prueba  $t$  para variables continuas y para variables categóricas se utilizó la prueba de  $\chi^2$ . La distribución de los datos se expresó como número (porcentaje) para las variables categóricas y como mediana (rango intercuartil) o media (desviación estándar) para las variables continuas.

Posteriormente, se empleó un análisis de regresión logística binaria para identificar el efecto de biomarcadores ajustados por las variables de confusión. Posteriormente, para obtener el modelo final (modelo clínico + biomarcadores), en el caso de ser necesario los marcadores se transformaron logarítmicamente ( $\log_e$ ), y se incluyeron en la regresión logística junto con las variables del modelo clínico.

Estos dos modelos (modelo inicial frente al modelo final) se compararon con la prueba de razón de verosimilitud (LRT), para contrastar el valor agregado de los biomarcadores al modelo inicial. Además, se realizó un análisis de las

características operativas del receptor (ROC) para determinar el área bajo la curva (AUC) de ambos modelos. A continuación, se aplicó la prueba del De Long para comparar el AUC de los modelos. Finalmente, se utilizó el algoritmo Panelomix [78] para seleccionar los puntos de corte con mejor sensibilidad para las variables continuas incluidas en el modelo final.

## **RESULTADOS**

**4.1 H-FABP as a Biomarker in Transient Ischemic Attack**

(Guamán- Pilco et al, J Cardiovasc Transl Res. 2024 Aug 19)

doi: 10.1007/s12265-024-10552-4



## H-FABP as a Biomarker in Transient Ischemic Attack

Daisy Guamán-Pilco<sup>1</sup> · Elvira Chocano<sup>1</sup> · Elena Palà<sup>1</sup> · Marcel Lamana-Vallverdú<sup>1</sup> · Anna Penalba<sup>1</sup> · Paula García-Rodríguez<sup>1</sup> · Marta Rubiera<sup>2</sup> · Alejandro Bustamante<sup>3</sup> · Àlex Rovira<sup>4</sup> · Soledad Pérez-Sánchez<sup>5,6</sup> · Leire Azurmendi<sup>7</sup> · Sandrine Reymond<sup>7</sup> · Jean-Charles Sánchez<sup>7</sup> · Joan Montaner<sup>1,5,6,8</sup> 

Received: 28 February 2024 / Accepted: 6 August 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

### Abstract

The study investigates the utility of heart fatty-acid binding protein (H-FABP) in distinguishing TIA from mimics. Data from 175 patients from the StrokeChip multicenter study was retrospectively analyzed. H-FABP level was measured using a rapid point-of-care test. Findings revealed that H-FABP levels were higher in individuals with TIA compared to mimics [3.10 ng/mL (IQR 2.13–4.78) vs. 1.70 ng/mL (IQR 1.23–2.38)] ( $p < 0.001$ ). The diagnostic performance of H-FABP, assessed using the area under the curve operating characteristic curve (AUC) was 0.83 (95% CI = 0.76–0.90) for the final model, indicating good discriminative ability. The PanelomiX determined that a combined cutoff of  $> 1.85$  ng/ml for H-FABP, age  $> 42.5$  years, and baseline NIHSS  $> 3.5$  had a 100% of sensitivity and 23.30% of specificity. The study suggests that H-FABP has potential as a TIA diagnostic biomarker. The rapid application of POCT's for H-FABP measurement supports its potential use in emergency departments and primary care settings.

**Keywords** TIA · H-FABP · POCT · Diagnostic · MIMIC · Biomarker · Ischemia

### Abbreviations

TIA	Transient ischemic attack
H-FABP	Heart fatty-acid binding protein
CT	Computed tomography
LRT	Likelihood ratio test
ROC	Receiver operating characteristic
AUC	Area under the curve

### Introduction

The incidence of stroke and transient ischemic attack (TIA) is expected to increase due to the progressive aging of the population and the increase in vascular risk factors [1]. In terms of mortality, stroke ranks as the second leading cause of death in many European countries and is the primary cause of death among women [2].

Transient ischemic attack continues to be a significant public health problem, as there is up to a 10% risk of recurrent stroke after TIA within 90 days and 20% within the first 3 months; approximately half of all recurrent

Associate Editor Craig M. Stolen oversaw the review of this article

✉ Joan Montaner  
jmontaner-ibis@us.es

- Neurovascular Research Laboratory Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- Stroke, Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- Department of Neurology, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain
- Section of Neuroradiology, Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

- Institute de Biomedicine of Seville, IBIH/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain
- Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain
- Translational Biomarker Group, Internal Medicine Department, University Medical Center, University of Geneva, Geneva, Switzerland
- Neurovascular Research Group, IBIH/Hospital Universitario Virgen Macarena/CSIC/University of Seville, Av. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain

Published online: 19 August 2024

 Springer

strokes after a TIA occur within the first 24 h. Prevention strategies could reduce up to 80% of strokes occurring after a TIA, emphasizing the critical importance of accurate diagnosis and early treatment [3, 4].

One challenge with accurate diagnosis stems from the fact that the established definition of TIA predates the era of advanced imaging techniques. Initially, the diagnosis was established based on time, with a limit of 24 h. However, it was later discovered that brain lesions could be associated with prolonged symptoms [5]. Nevertheless, even today, the gold standard for the diagnosis of TIA still largely relies on clinical manifestations, which usually persist for less than an hour. The most frequent symptoms are motor weakness, loss of sensation, visual field defects, and speech disorders, including aphasia and dysarthria [6, 7].

Despite progress in the definition of TIA, the diagnosis of this disease remains a challenge for physicians, and in this regard, blood biomarkers are emerging as important tools for the diagnosis, risk stratification, and individual treatment of minor strokes and TIAs [8].

This challenge largely arises from the high incidence of TIA mimics, cases with similar symptoms but lacking a vascular origin, such as tumors or epilepsy or cases with nonfocal symptoms such as unexplained medical conditions, syncope/presyncope, or acute confusional states [9, 10]. According to this framework, some studies have suggested that almost 40% of patients with suspected TIA have mimics; hence, careful assessment of the clinical history and specialized clinical evaluations are important [6, 11].

Several blood biomarkers have been studied for stroke diagnosis, with heart fatty acid binding protein (H-FABP) emerging as a promising candidate due to its presence and role in the intracellular transport of long-chain fatty acids after ischemic injury [12–14]. Investigations into its potential diagnostic and prognostic value for stroke and TIA have been undertaken [15–17]. While FABP primarily indicates myocardial injury, other biomarkers such as BNP, NT-proBNP, S100B, GFAP, and D-dimer are closely tied to stroke pathology, reflecting brain injury, inflammation, or thrombotic processes. Recent studies have also implicated HFABP in acute stroke [18], prompting an examination of its associations TIA, potentially broadening its diagnostic utility beyond acute stroke scenarios.

A biomarker guide is a promising strategy to aid in diagnosis and improve early treatment. Therefore, this paper aimed to analyze the usefulness of H-FABP as a biomarker for differentiating TIA from mimics. In addition, we briefly explored the value of this protein in discriminating between vascular brain damage and nonbrain damage in TIA patients (Table 1 supplementary data).

## Methods

### Patients and Protocol

Patients with neurological transient symptoms and suspected TIA were selected from the multicentric StrokeChip study, which recruited patients with suspected TIA, among others [19]. Blood samples were drawn within <6 h after symptom onset and before the administration of acute-phase therapies. The only exclusion criterion was the impossibility of obtaining blood samples and the absence of informed consent.

The diagnostic criteria to classify TIA patients was based on the WHO-recommended criteria; focused on: time (<24 h), brain computed tomography (CT) findings (absence of acute ischemic or hemorrhagic lesion), and symptomatology. Finally, TIA diagnosis was performed by trained neurologist at each center, and was confirmed by an independent neurologist through the review of clinical data and complementary examinations. All pathologies that were initially treated as a TIA and those that did not meet the diagnostic criteria were considered mimics. Additionally, the mimic diagnosis was supported by ancillary testing as deemed necessary in each case (i.e., EEG, lumbar puncture, etc.).

This cohort was considered due to the availability of samples and approval of the study by the hospital ethics committee. The study was approved by the ethics committees of the participating centers, and all patients or their relatives provided written informed consent.

### Biomarker Measurement

Blood sample was collected in serum tubes at the time of inclusion and centrifuged at 1,500 × g at 4 °C for 15 min, after which aliquots of serum were frozen at -80 °C until biomarker determination. H-FABP serum levels were determined using a rapid test (TBICheck™, ABCDx SA, Switzerland). This is an immunochromatographic test for the quantitative determination of H-FABP in whole blood, serum, or plasma that lasts 15 min and yields an H-FABP concentration in ng/ml. First, 25 µl of serum and a drop of diluent (from the same kit) were added to the test strip, after which the mixture was introduced into a cube reader according to the manufacturer's instructions. After waiting for 15 min, the Cube Reader was used to measure the protein concentration.

### Statistical Analysis

All statistical and graphical analyses were performed with R version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing,

Vienne, Austria). According to the distribution of the data, the data are expressed herein as numbers (percentages) for categorical variables and as medians (interquartile ranges) or means and standard deviations for continuous variables. For univariate analysis, the Mann–Whitney  $U$  test or  $t$  test was used for continuous variables, and the  $\chi^2$  test was used for categorical variables.

A binary logistic regression analysis that variables associated with TIA was performed. For clinical model the confounders were selected base on bibliography. The biomarker was subsequently added to this clinical model, yielding a final model (clinical + biomarker). The biomarker value was log-transformed ( $\log_e$ ) for multivariable models. These two models were compared with the likelihood ratio test (LRT) to determine the added value of the molecule to the clinical model. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to calculate the area under the curve (AUC) for the two models (clinical model and clinical model + biomarker). DeLong's test was applied to compare the area under the curve (AUC) of both models. Finally, the PanelomiX algorithm was used to select the cutoff values, including only for the biomarker and age (variables included in the final model), optimizing the sensitivity for predicting TIA.

## Results

### Sample Characterization

A total of 266 samples were included in the present study. Eleven samples were hemolyzed and were not included in the analysis (considered missing data). Therefore, one hundred seventy-five patients were included; of these, 131 had TIA, and 44 had mimics (Fig. 1—supplementary data). The clinical and demographic characteristics of the patients included are listed in Table 1. On the other hand, the most frequent disorders in the mimic group were conversion disorder (31.7%), vasovagal syncope (22.0%), migraine (17.7%), epilepsy (7.3%), peripheral nerve pathology (4.9%), drug intoxication (4.9%), alcohol intoxication (4.9%), tumors (2.4%), acute confusional state (2.4%), and hyperglycemia (2.4%).

### TIA vs. MIMIC

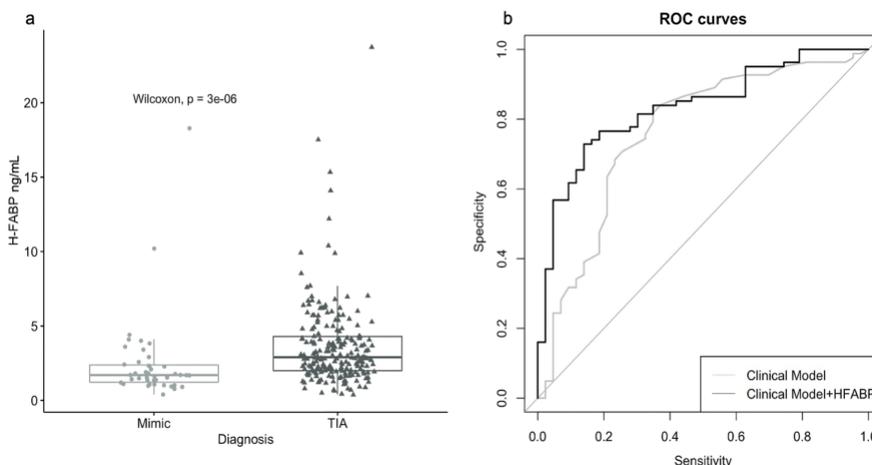
The level of H-FABP was greater in individuals with TIA than in those without TIA [3.10 ng/mL (IQR 2.13–4.78) versus 1.70 ng/mL (IQR 1.23–2.38)] ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1a). The discrimination ability (area under the ROC curve) of the clinical model was 0.82 (95% CI, 0.76–0.90), and for the final model was 0.83 (95% CI, 0.76–0.90) (Fig. 1b).

The clinical model was developed based on the bibliography. Therefore, the clinical model included age, dyslipidemia, sex and baseline NIHSS. The results of the final

**Table 1** Clinical characteristics of the StrokeChip cohort and comparisons according to the TIA diagnosis

	Mimic (N=44)	TIA (N=131)	<i>p</i> value
Age	55.00[42.00, 67.00]	73.00[62.00, 81.00]	<0.001*
Sex (Female)	25 (55.6%)	42 (49.4%)	0.505
Smoking	13 (28.9%)	19 (22.4%)	0.410
Alcohol	3 (6.7%)	15 (17.6%)	0.085
Hypertension	21 (46.7%)	60 (70.6%)	0.007+
Diabetes mellitus	7 (15.6%)	18 (21.2%)	0.439
Dyslipidemia	12 (26.7%)	47 (55.3%)	0.002+
SBP, mm Hg	145.74 (22.69)	156.86 (31.76)	0.031+
DBP, mm Hg	82.10 (13.08)	83.51 (18.23)	0.631
Glycemia, mg/dL	110.50 [100.75–125.50]	108.00 [97.00–125.00]	0.607
NIHSS	1.00 [1.00, 2.00]	2.00 [1.00, 3.25]	<0.001*
AF	4 (8.9%)	14 (16.5%)	0.243
Previous Stroke	10 (22.2%)	20 (23.5%)	0.866
Heart disease	2 (4.4%)	12 (14.0%)	0.094
Prestroke mRS score	0.000 [0.000, 0.000]	0.000 [0.000, 1.000]	0.552
OTB time	2:46 [5:59–0:30]	2:42 [5:40–0:40]	0.907

\*  $P$  value < 0.001; +  $P$  value < 0.05. SBP Systolic blood pressure; DBP Diastolic blood pressure; NIHSS National Institute of Health Stroke Scale, calculated at onset of the symptoms; AF Atrial fibrillation; OTB time Symptoms onset to blood collection time



**Fig. 1** **a** FABP serum level distribution according to the presence of clinical diagnosis. Boxplot distributions of the TIA and mimic groups are shown. **b** Discrimination power of TIA diagnosis for the clinical

model and the final model. ROC curve: ability to distinguish between TIA and mimics

model suggest that the selected biomarker (H-FABP) is associated with the final diagnosis after adjusting for the selected clinical variables (age, dyslipidemia, sex and baseline NIHSS). The results of the likelihood ratio test (LRT) indicated that the final model (clinical model+biomarker) described the data better than the clinical model alone ( $p=0.015$ ). The addition of the biomarker to the clinical model increased the AUC of the model from 0.82 (95% CI=0.76–0.90) to 0.83 (95% CI=0.76–0.90), which according to DeLong’s test, this minor improvement was not statistically significant ( $p=0.497$ ) (Table 2). Additionally, data from the imaging results were analyzed and can be found in the supplementary data (Table 1 and Fig. 2 – supplementary data).

The PanelomiX algorithm selected a cutoff of > 1.85 ng/ml for H-FABP, age > 42.5 years, and baseline NIHSS > 3.5. A positive case was considered when more than one of these criteria were met. The sensitivity and specificity were 100.00% and 23.30%, respectively.

In addition, the levels of this protein analyzed in the comorbidities of the complete sample indicate elevated values (statistically significant) in nonsmokers ( $p=0.0007$ ), hypertensive patients ( $p=0.002$ ), and those with atrial fibrillation ( $p=0.004$ ) (Fig. 3—supplementary data). No statistical difference was observed between the different diseases in the control group (mimic group) regarding the level of H-FABP (Fig. 4 -supplementary data).

**Table 2** Binary logistic regression

Variable	Clinical			Clinical + Biomarker		
	OR	[95% CI]	<i>p</i> value	OR	[95% CI]	<i>p</i> value
Age	1.05	(1.02;1.09)	<0.001	1.04	(1.00;1.07)	0.021
Dyslipidemia	2.38	(0.96;6.10)	0.058	2.37	(0.95;5.41)	0.073
Sex	0.35	(1.13;0.88)	0.043	0.39	(0.14;0.99)	0.055
Baseline NIHSS	1.61	(1.14;2.46)	0.022	1.54	(1.11;2.34)	0.024
Log <sub>e</sub> (H-FABP)	-	-	-	2.47	(1.17;5.71)	0.023
LRT						0.015
AUC	0.82	(0.76;0.90)		0.83	(0.76;0.90)	
DeLong’s test		(0.76;0.90)			(0.76;0.90)	<i>p</i> value 0.497

OR odds ratio, LRT likelihood ratio test, AUC Area under the curve

## Discussion

The main finding of this study was that the serum concentration of H-FABP was elevated in patients with TIA compared to that in mimic patients.

H-FABP, a small cytoplasmic protein involved in intracellular fatty acid transport, is released from injured endothelial cells and neuronal cell bodies. It is expressed in several tissues, especially in the heart and brain and has been extensively studied in myocardial infarction, where it is a recognized biomarker for this condition [14, 20]. Although not stroke specific, increased levels of this protein have been observed in stroke patients, particularly in the first hours after onset [13, 15]. Therefore, it was hypothesized that this marker might be elevated in patients with TIA.

Our finding is consistent with the hypothesis that H-FABP levels might be elevated in patients with transient ischemic attacks due to similar mechanisms of endothelial and neuronal injury observed in more severe ischemic events. While previous studies have shown elevated H-FABP levels in stroke patients, our research contributes to the understanding of its role in TIA, a less severe but clinically significant ischemic event.

Prior studies have measured H-FABP levels in the plasma and serum of ischemic stroke patients, and many have shown elevated H-FABP levels. One study reported elevated H-FABP levels in 80% of stroke patients [21]. Furthermore, compared with the baseline clinical model, the combination of H-FABP with interleukin-6 improved stroke prediction and discrimination between patients with high and low recurrence risk [22]. Notably, TIAs typically exhibit lower H-FABP levels than established strokes [16].

Our results partially support previous findings. While we did not measure the protein level in ischemic stroke patients, we observed elevated levels in TIA patients compared to those without vascular diseases (mimics). However, we cannot make certain conclusions because statistical analysis was not performed due to a lack of data collection. Similarly, the comorbidities results could indicate a correlation between risk factors and TIA, as the highest levels are observed in patients with hypertension and atrial fibrillation. However, the elevated levels in non-smoking patients are counterintuitive and require further exploration.

The H-FABP biomarker has already been studied in the field of cerebral ischemia, focusing on stroke. However, to our knowledge, only one study has tested it in TIA patients. Similarly, in the study carried out by Dolmans et al. [23], from the panel of biomarkers that they measured, the only biomarker elevated in TIA was H-FABP. However, this biomarker was not predictive according to

logistic regression analysis, while the significant results in our binary logistic regression and LRT analysis suggest that H-FABP is a relevant biomarker for differentiating between TIA and mimic conditions. This supports the potential clinical utility of H-FABP in early diagnosis and risk stratification. However, the modest improvement in the AUC when adding H-FABP to the clinical model, as indicated by DeLong's test, suggests that while H-FABP is a valuable biomarker, its predictive power might be limited when used alone. This finding underscores the importance of combining H-FABP with other clinical variables and a large sample to enhance diagnostic accuracy.

Notably, we quantified this biomarker with the help of a POCT, which was unlike the protocol a previous study that used sandwich ELISA procedures. We also used Panelomix to select the cutoff points with the greatest sensitivity for the variables in the final model, aiming to improve the selection of positive cases.

Although TIA is considered a transient event that does not cause brain injury, some studies have shown ischemic changes even in patients with brief symptoms when subjected to DWI studies [24, 25]. However, such studies are not always available in all hospitals, making POCT a valuable tool due to its accessibility and potential use in various healthcare settings. Our secondary results shown in the supplementary data suggest that the highest levels of FABP are found in those patients with lesions in DWI-MRI sequences in the hyperacute phase of TIA- [5]. Several relevant studies have focused on the value of H-FABP combined with other biomarkers for differentiating between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury [26, 27]. In this regard, we hypothesized that we would obtain similar results. Nonetheless, our results in the comparison group indicated only a trend (Fig. 2a—supplementary data) that was not significant, and the AUC prediction was moderate (Fig. 2b—supplementary data). Despite this it is essential to validate these results in a larger sample size to ensure robust results.

Our primary findings align with existing research on the role of H-FABP in ischemic injury, reinforcing its potential as a valuable biomarker for TIA. However, further studies with larger sample sizes and more comprehensive data collection are necessary to fully elucidate the diagnostic and prognostic value of H-FABP in TIA and other cerebrovascular conditions.

We chose a POCT to measure the H-FABP marker because such testing plays a crucial role in primary health care, emergency departments, and prehospital services. In addition, it provides valuable information to support decisions about treatment and referral to secondary care [28].

In the case of the emergency department and primary care, overcrowding results in long waiting times and delays in treatment, which leads to increased mortality rates and

thus should be considered a severe public health problem [29]. The use of POCTs could substantially reduce this waiting time, prevent unnecessary referrals to specialized or secondary care, and improve outcomes. In this case, POCT analysis has been shown to be faster than ELISA and other laboratory tests. All of these factors lead to improved quality of prehospital and hospital emergency care, initiating and guiding early diagnostic and treatment decisions [30, 31].

Specifically, studies carried out by Lahr et al. Moreover, Weber et al. demonstrated the relevance and efficacy of the use of POCTs in the treatment of stroke and in decision-making with respect to the administration of thrombolysis therapy. This is of utmost importance, as delays in extra test results are one of the main obstacles to the early initiation of thrombolysis therapy [32, 33].

The results obtained in the present study suggest that patients with low H-FABP levels may not need to be referred to specialized/secondary care. This could lead to cost savings in the health care system, especially for cases mimicking a TIA. Therefore, the application of the H-FABP biomarker in emergency departments and primary care not only could facilitate the discrimination between cases and the correct diagnosis of patients but may also help guide treatment decisions.

Overall, our study suggested that H-FABP may serve as a useful biomarker for diagnosing TIA, especially when combined with other clinical indicators. Its use in emergency departments and primary care settings could expedite diagnosis and treatment decisions, potentially reducing mortality rates and health care costs. Further research with larger cohorts is warranted to validate our findings and explore the full diagnostic potential of these markers.

## Limitations

This study has several limitations. First, a small sample was used. Second, the minor amount of information gathered per patient and the missing information on myocardial infarction and acute coronary ischemia could have greatly influenced the results we obtained since this biomarker is closely related to CHD. Third, the results obtained by using PanelomiX should be interpreted carefully for extrapolation to a different sample. Fourth, the present study was not initially designed for the evaluation of TIA. Therefore, some important data, such as symptom duration, were not available. Fifth, no imaging study was performed after including patients on the StrokeChip to confirm that the TIA group so might contain minor strokes. Finally, although all the samples had the same storage period at the time of H-FABP measurement, some of the biobanked material had long storage periods that might have affected the FABP values, but

this is something that we have not properly studied. These limitations might be resolved in subsequent studies.

## Conclusion

In the present study, we showed that the serum concentration of H-FABP was higher in patients with TIA than in patients with mimic cases. Similarly, in the final model, we were able to observe an association between the protein level and final diagnosis after adjusting for age, dyslipidemia, sex and baseline NIHSS (confounding variables). These results could indicate the potential diagnostic value of this biomarker and overcome the present limitations.

Finally, the availability of a rapid test will allow the testing of its clinical value in real life at emergency departments or general practitioner (GP) offices using rapid fingerpick testing.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12265-024-10552-4>.

**Authors Contribution** Guarantor: Joan Montaner (JM). Contributorship: Daisy Guamán-Pilco: Handling of samples, statistical analysis of the data, and drafting of the manuscript. Elvira Chocano; Anna Penalba; Paula García Rodríguez: Handling of the samples and performance of the experiments. Elena Palà: Manuscript review. Marcel Lamana-Vallverdú: Statistical analysis review. Marta Rubiera; Alejandro Bustamante; Soledad Pérez-Sánchez: Patient recruitment. Alex Rovira: DWI measurements. Leire Azurmendi-Gil; Sandrine Reymond; Jean-Charles Sánchez: POCT development and set-up. Joan Montaner: Obtained funding and developed the protocol for the studies included in the present manuscript. All authors made substantial contributions to the conception or design of the work or the analysis or interpretation of data; have critically reviewed the manuscript; have approved the final version to be published; and agree to be accountable for all aspects of this work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Funding** The first study (StrokeChip) was supported by the research project IDI20130009. Development, design, and validation of a Laboratory-on-a-chip tool for the early diagnosis of stroke and its differentiation from analogous pathologies, of the Center for the Development of Industrial Technology (CDTI). The Neurovascular Research Laboratory of the Vall d'Hebron Research Institute participates in the Spanish stroke research network RICORS (RD16/0019/00021) and received funding from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) DTS14/00004, PI18/00804, co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER), for stroke biomarker research. The funders had no role in the study design or conduction.

**Data Availability** Data access statement: Is not available to the general public.

## Declarations

**Ethical Approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

The study protocol was approved by the Hospital Vall d'Hebrón Ethics Committee.

**Informed Consent** All patients or their relatives signed informed consent.

**Conflicting Interests** The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Díaz-Guzmán J, Egido J-A, Gabriel-Sánchez R, Barberá-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C, Group, on behalf of the I. S. I. of the S. P. of the S. C. D. S. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34(4):272–81. <https://doi.org/10.1159/000342652>.
- The Burden of Stroke in Europe | The Burden of Stroke in Europe Report. 2017. Retrieved from <https://strokeeurope.eu/index/the-burden-of-stroke-in-europe/>. Accessed 29 Aug 2022.
- Coutts SB. Diagnosis and management of transient ischemic attack. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2017;23(1, Cerebrovascular Disease):82–92. <https://doi.org/10.1212/CON.00000000000000424>.
- Chandratheva A, Mehta Z, Geraghty OC, Marquardt L, Rothwell PM. Population-based study of risk and predictors of stroke in the first few hours after a TIA. *Neurology*. 2009;72(22):1941–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181a826ad>.
- Francisco P, Joan M, Álex R, Pilar D, Manuel Q, José Á-S. Higher risk of further vascular events among transient ischemic attack patients with diffusion-weighted imaging acute ischemic lesions. *Stroke*. 2004;35(10):2313–9. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000141703.21173.91>.
- Clissold B, Phan TG, Ly J, Singhal S, Srikanth V, Ma H. Current aspects of TIA management. *J Clin Neurosci*. 2020;72:20–5. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.12.032>.
- Magnusson C, Lövgren E, Alfreðsson J, Axelsson C, Andersson Hagiwara M, Rosengren L, .... Jood K. Difficulties in the prehospital assessment of patients with TIA/stroke. *Acta Neurol Scand*. 2021;143(3):318–325. <https://doi.org/10.1111/ane.13369>.
- Jadav RK, Mortazavi R, Yee KC. Blood biomarkers for triaging patients for suspected stroke: every minute counts. *J Clin Med*. 2022;11(14):4243. <https://doi.org/10.3390/jcm11144243>.
- Caplan LR, Searls DE, Hon FKS. Cerebrovascular disease. *Med Clin North Am*. 2009;93(2):353–69. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.09.004>.
- Hand PJ, Joseph K, Lindley RI, Dennis MS, Wardlaw JM. Distinguishing between stroke and mimic at the bedside. *Stroke*. 2006;37(3):769–75. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000204041.13466.4c>.
- Nadarajan V, Perry RJ, Johnson J, Werring DJ. Transient ischaemic attacks: mimics and chameleons. *Pract Neurol*. 2014;14(1):23–31. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2013-000782>.
- Li J, Wang Y. Blood biomarkers in minor stroke and transient ischemic attack. *Neurosci Bull*. 2016;32(5):463–8. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0038-5>.
- Pelers MMAL, Glatz JFC. Detection of brain injury by fatty acid-binding proteins. *Clin Chem Lab Med (CCLM)*. 2005;43(8):802–9. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.135>.
- Ye X, He Y, Wang S, Wong GT, Irwin MG, Xia Z. Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) as a biomarker for acute myocardial injury and long-term post-ischemic prognosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(7):1155–63. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.37>.
- Zimmermann-Ivol CG, Burkhard PR, Floch-Rohr JL, Allard L, Hochstrasser DF, Sanchez J-C. Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study \*. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(1):66–72. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300066-MCP200>.
- Wunderlich MT, Hanhoff T, Goertler M, Spener F, Glatz JFC, Wallesch C-W, Pelers MMAL. Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *J Neurol*. 2005;252(6):718–24. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0725-z>.
- Greisenegger S, Segal HC, Burgess AI, Poole DL, Mehta Z, Rothwell PM. Biomarkers and mortality after TIA and minor ischemic stroke: population-based study. *Stroke*. 2015;46(3):659–66. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007624>.
- Guo Q, Kawahata I, Cheng A, Jia W, Wang H, Fukunaga K. Fatty acid-binding proteins: their roles in ischemic stroke and potential as drug targets. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9648. <https://doi.org/10.3390/ijms23179648>.
- Bustamante A, López-Cancio E, Pich S, Penalba A, Giralt D, García-Bercooso T, .... Montaner J. Blood biomarkers for the early diagnosis of stroke. *Stroke*. 2017;48(9):2419–2425. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017076>.
- Veerkamp JH, Zimmermann AW. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *J Mol Neurosci*. 2001;16(2):133–42. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2:133>.
- Park S-Y, Kim M-H, Kim O-J, Ahn H-J, Song J-Y, Jeong J-Y, Oh S-H. Plasma heart-type fatty acid binding protein level in acute ischemic stroke: Comparative analysis with plasma S100B level for diagnosis of stroke and prediction of long-term clinical outcome. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013;115(4):405–10. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.06.004>.
- Park S-Y, Kim J, Kim O-J, Kim J-K, Song J, Shin D-A, Oh S-H. Predictive value of circulating interleukin-6 and heart-type fatty acid binding protein for three months clinical outcome in acute cerebral infarction: multiple blood markers profiling study. *Crit Care*. 2013;17(2):R45. <https://doi.org/10.1186/cc12564>.
- Dolmans LS, Rutten F, Bartelink M-LEL, van Dijk EJ, Nederkoorn PJ, Kappelle J, Hoes AW. Serum biomarkers in patients suspected of transient ischaemic attack in primary care: a diagnostic accuracy study. *BMJ Open*. 2019;9(10). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031774>.
- Sadighi A, Abedi V, Stanciu A, El Andary N, Banciu M, Holland N, Zand R. Six-month outcome of transient ischemic attack and its mimics. *Front Neurol*. 2019;10:294. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00294>.
- Amarencio P, Lavallée PC, Labreuche J, Albers GW, Bornstein NM, Canhão P, .... Wong LKS. One-year risk of stroke after transient ischemic attack or minor stroke. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1533–1542. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412981>.
- Lagerstedt L, Egea-Guerrero JJ, Bustamante A, Montaner J, Rodríguez-Rodríguez A, El Rahal A, .... Sanchez J-C. H-FABP: A new biomarker to differentiate between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury. *PLoS ONE*. 2017;12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175572>.
- Lagerstedt L, Egea-Guerrero JJ, Bustamante A, Rodríguez-Rodríguez A, El Rahal A, Quintana-Díaz M, .... Sanchez J-C. Combining H-FABP and GFAP increases the capacity to differentiate between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury. *PLoS ONE*. 2018;13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200394>.
- Howick J, Cals WL, Jones C, Price CP, Plüddemann A, Heneghan C, .... Thompson M. Current and future use of point-of-care tests in primary care: an international survey in Australia, Belgium,

- The Netherlands, the UK and the USA. *BMJ Open*. 2014;4(8). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005611>.
29. Guttman A, Schull MJ, Vermeulen MJ, Stukel TA. Association between waiting times and short term mortality and hospital admission after departure from emergency department: population based cohort study from Ontario, Canada. *BMJ*. 2011;342:d2983. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2983>.
  30. Nørgaard B, Mogensen CB. Blood sample tube transporting system versus point of care technology in an emergency department; effect on time from collection to reporting? A randomised trial. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012;20:71. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-20-71>.
  31. Rooney KD, Schilling UM. Point-of-care testing in the overcrowded emergency department – can it make a difference? *Crit Care*. 2014;18(6):692. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0692-9>.
  32. Lahr MMH, van der Zee D-J, Luijckx G-J, Vroomen PCAJ, Buskens E. A simulation-based approach for improving utilization of thrombolysis in acute brain infarction. *Med Care*. 2013;51(12):1101–5. <https://doi.org/10.1097/MLR.0b013e3182a3e505>.
  33. Weber JE, Ebinger M, Rozanski M, Waldschmidt C, Wendt M, Winter B, . . . , STEMO-Consortium, F. T. Prehospital thrombolysis in acute stroke: Results of the PHANTOM-S pilot study. *Neurology*. 2013;80(2):163–168. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827b90c5>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Supplementary Information

Table 1. Clinical characteristics of the MRI cohort and comparison according to DWI results

	negative DWI (N=73)	positive DWI (N=18)	p value
<b>Age</b>			0.601
Median	66.00 [60.00, 75.00]	71.50[59.75, 77.00]	
<b>Sex (Female)</b>	36 (49.3%)	5 (27.8%)	0.100
<b>Smoking</b>	13 (18.3%)	3 (16.7%)	0.871
<b>Alcohol</b>	3 (4.2%)	1 (5.6%)	0.808
<b>Hypertension</b>	36 (50.7%)	9 (50.0%)	0.957
<b>Diabetes mellitus</b>	16 (22.5%)	4 (22.2%)	0.977
<b>Dyslipidemia</b>	20 (28.2%)	4 (22.2%)	0.612

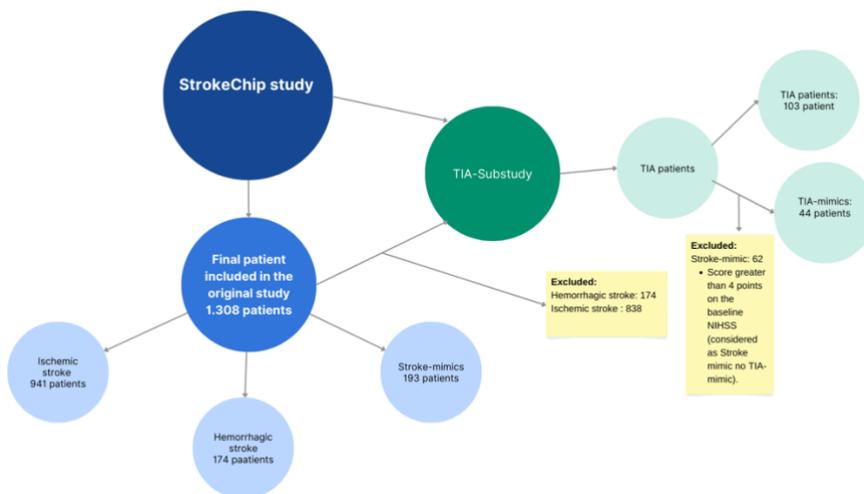


Fig. 1. Diagram of the patients selected from the original StrokeChip study for this substudy.

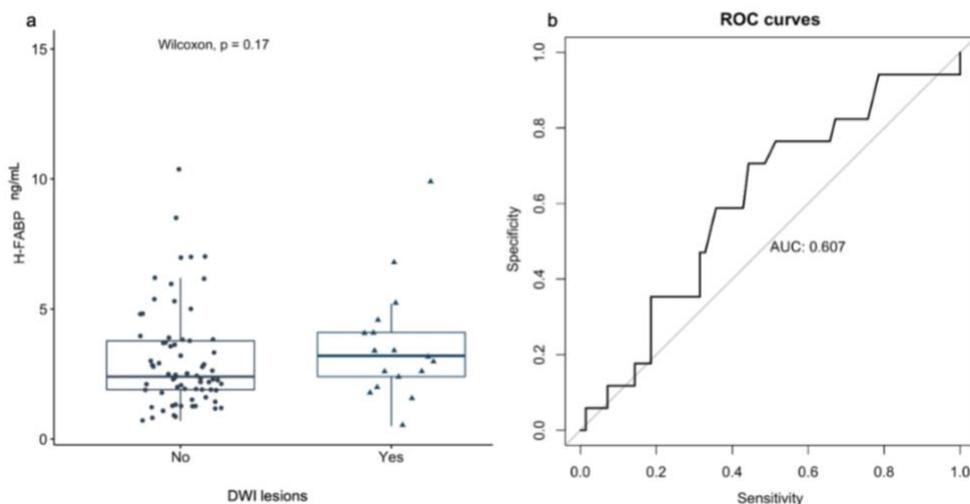


Fig. 2. 2a. FABP serum level distribution according to the presence of brain ischemic lesions in the DWI-MRI sequences. Boxplot distributions of the DWI positive and DWI negative groups are shown. Figure 2b. H-FABP discrimination power for ischemic lesions in TIA patients. ROC curve: ability to distinguish between DWI positive and DWI negative patients is shown.

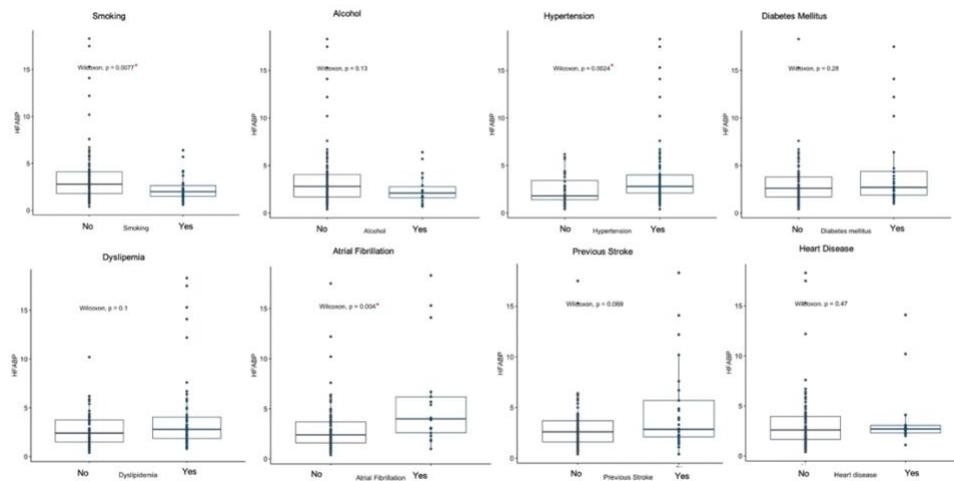


Fig 3. Distribution of serum HFABP levels according to different comorbidities.

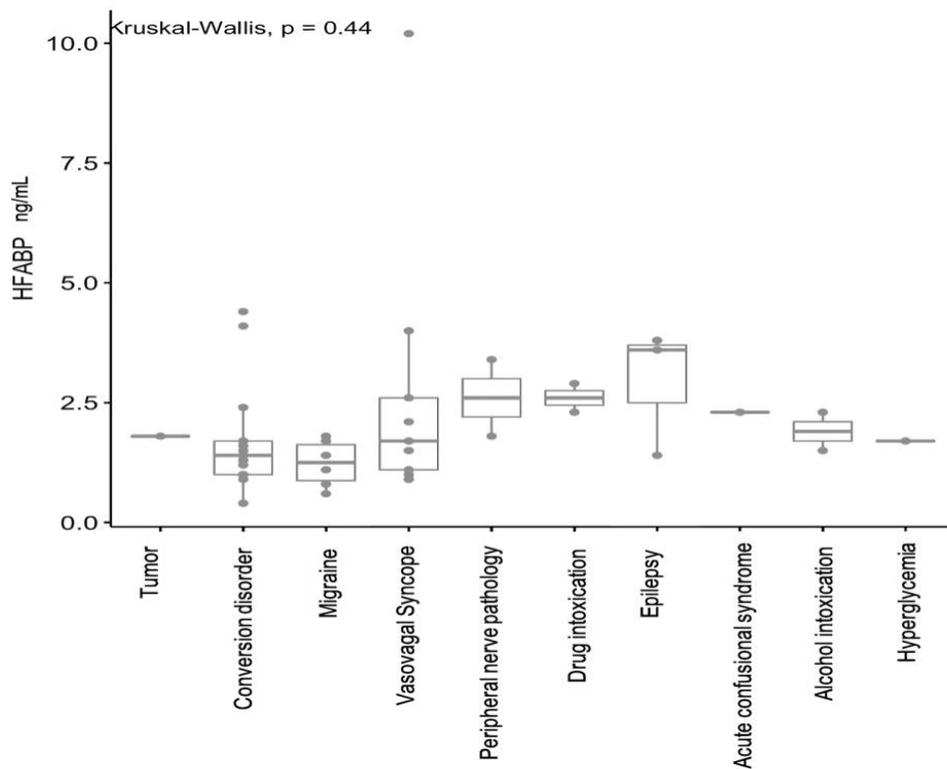


Fig 4. Boxplot distributions of H-FABP between the different diseases of the control group (mimics).

**4.2 A panel of blood biomarkers for the diagnosis of transient ischemic attacks**

## **A panel of blood biomarkers for the diagnosis of transient ischemic attacks**

Daisy Guamán-Pilco <sup>1</sup>, Elena Palà <sup>1</sup>, Marcel Lamana-Vallverdú<sup>1</sup>, Anna Penalba <sup>1</sup>, Paula García-Rodríguez<sup>1</sup>, Marta Rubiera <sup>2</sup>, Alejandro Bustamante <sup>3</sup>, Soledad Pérez-Sánchez <sup>4</sup>, Joan Montaner <sup>1,4</sup>.

### **Abstract**

Accurate diagnosis of transient ischemic attacks (TIAs) is challenging. This study aimed to analyze blood biomarkers to distinguish TIAs from mimics. The levels of eight candidate biomarkers, were measured in 234 patients suspected of having TIA of these 103 TIA and 131 mimic. The study compared TIA vs mimic, examined the impact of the biomarkers via logistic regression, compared models with likelihood ratio tests, assessed predictive accuracy with receiver operating characteristic (ROC) analysis, and optimized cutoff values using the PanelomiX algorithm. Results showed that ApoC-III, IL-6, and vWF were the most effective in discriminating TIAs from mimics after adjustment for clinical variables. The area under the ROC curve (AUC) was 0.76 for ApoC-III; 0.77 for IL-6; 0.76 for vWF; and 0.75 for the clinical model. Likelihood ratio test indicated that these biomarkers had better fits than the clinical model: Apo-CIII ( $p \leq 0.031$ ), IL-6 ( $p \leq 0.030$ ), and vWF ( $p \leq 0.040$ ). Using the PanelomiX algorithm, a model incorporating biomarker thresholds (Apo-CIII  $>132.29$  ng/mL, IL-6  $>5.45$  pg/mL, vWF  $<280.09\%$ , NIHSS score  $>4.5$ , and age  $>41.5$  years) achieved a sensitivity of 100% and a specificity of 28% for distinguishing TIAs from mimics. These findings suggest that combining blood biomarkers with clinical data could enhance TIA diagnosis.

**Key words:** TIA; Mimics; Biomarkers; Apo-CIII; IL-6; vWF; Blood.

---

1 Neurovascular Research Laboratory Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR) Universitat Autònoma de Barcelona Barcelona Spain.

2 Stroke, Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona Spain.

3 Department of Neurology, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona (08916), Spain.

4 Institute de Biomedicine of Seville, IBiS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville & Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain.

✉ Joan Montaner  
[jmontaner-ibis@us.es](mailto:jmontaner-ibis@us.es)

---

## **Introduction**

Cerebrovascular diseases (CVDs) constitute a significant global burden and are the second most common cause of death [1] [2]. In Europe, CVDs are the leading cause of disability, affecting more than one million people annually and imposing substantial health care expenditures [3] [4]; this figure is expected to increase with population aging [1].

Stroke is broadly categorized into hemorrhagic and ischemic types, predominantly manifesting as the latter [5]. Transient ischemic attack

(TIA), a prevalent neurological emergency, deserves attention due to its association with subsequent CVD development [6] [7] [8].

The current definition of TIA, endorsed by the American Heart Association, is "a transient episode of neurological dysfunction caused by focal cerebral, spinal, or retinal ischemia without acute infarction" [9,10].

Variations in this definition over time have complicated TIA diagnosis. Additionally, the high

prevalence of disorders that simulate TIA makes diagnosis even more challenging. These disorders are known as mimics [11] since they usually present similar symptoms that are easily confused with a TIA, and they typically disappear during or even before evaluation.

Accurate TIA diagnosis hinges on early clinical evaluation, emphasizing risk factors such as age, sex, obesity, hypertension, diabetes mellitus, and smoking [12]. Additional diagnostic indicators include symptom duration, imaging findings, and personal/family vascular history [13].

Despite advances, diagnosis relies heavily on expert clinical interpretation, which is occasionally supplemented by advanced imaging techniques due to the limitations of clinical history interpretation.

Several investigations have demonstrated the added clinical value of several biomarkers in the neurovascular context; therefore, studying these proteins has emerged as one of the most promising alternatives for diagnosing stroke and determining the prognosis.

Therefore, we aimed to evaluate the role of eight candidate proteins previously assessed in the field of ischemic stroke in discriminating between TIA- and TIA-mimicking conditions [14], including D-dimer [15], endostatin [16], apolipoprotein CIII (Apo-CIII) [17], growth-related oncogene- $\alpha$  (GROA) [14], interleukin (IL-6) [18], N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NTproBNP) [19], vascular adhesion protein-1 (VAP-1) [20], and von Willebrand factor (vWF) [21]. The selection of these proteins was based on available data and a literature review, focusing on proteins with

optimal coefficients of variation in experimental settings

.

## **Methods**

### **Patients and protocol**

From the prospectively enrolled patient cohort of the multicenter StrokeChip study, we specifically selected individuals with a conclusive diagnosis of TIA, which was validated through CT studies and confirmed by a neurologist. For the mimic group, all patients with an initial NIHSS score less than 4 points were selected. This study (PR(AG)80/2012) was approved by the Ethics Committees of Vall d'Hebron University Hospital, Tries i Pujol University Hospital, Bellvitge University Hospital, Josep Trueta University Hospital, Joan XXIII University Hospital, and Verge de la Cinta University Hospital, and all patients or their relatives provided written informed

consent. The only exclusion criterion was the impossibility to obtaining blood samples [14].

### **Sample selection and collection**

Samples were drawn <6 hours after symptom onset and prior to the administration of acute-phase therapies; samples were collected in EDTA tubes at the time of inclusion. The samples were centrifuged at  $1,500 \times g$  and  $4^\circ C$  for 15 min, after which the plasma samples were frozen at  $-80^\circ C$  until biomarker measurement.

### **Biomarker measurement**

A total of eight protein biomarkers were selected for measurement: apolipoprotein CIII (Apo-CIII), D-dimer, endostatin, growth-related

oncogene- $\alpha$  (GROA), interleukin-6 (IL-6), N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), vascular adhesion protein-1 (VAP-1), and von Willebrand factor (vWF).

The different immunoassays that were performed are listed in *Supplemental Method I*. All the assays were performed according to the manufacturer's instructions. The samples were tested in duplicate, and the mean intra-assay coefficient of variation was <20%. Interassay variation was determined by testing a commercial internal control two times on each plate (human serum type AB, male, coagulation, Sigma–Aldrich, cat. no. H6914). All the measured proteins had an interassay coefficient of variation <20%.

### **Statistical analysis**

All the statistical analyses were performed with R version

2022.7.1.554 R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria. The data are expressed as counts (percentages) for categorical variables and as medians (interquartile ranges) for continuous variables. Categorical variables were compared between two groups using the chi-square test, and continuous variables were compared between two groups using the Mann–Whitney–Wilcoxon test. Correlations between variables were evaluated with Spearman's rank correlation.

Binary logistic regression analysis was used to determine the associations of biomarker levels with TIA after adjustment for confounders. A clinical model was constructed based on the literature search. Subsequently, values of the eight markers were log transformed (loge), and the markers were evaluated after adjustment for the covariates.

The models including the biomarker were compared against the clinical with the likelihood ratio test (LRT) to determine the value added by the biomarkers. An individual significance level  $\alpha$  of 0.05 ( $\alpha$  = significance level) was used for each test; given the explorative nature of this work, no multiplicity correction of the p values was performed. Receiver

### **Results**

#### **Characteristics of the sample**

A total of 234 patients (131 with mimics and 103 with TIAs) were included in the present study. The clinical and demographic characteristics of the patients in the cohort are listed in Table 1. The Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification was used to classify patients with TIAs as follows: undetermined etiology (46%), cardioembolic etiology (27%), atherosclerosis (16%), and lacunar etiology (11%).

operating characteristic (ROC) analysis was performed to determine the area under the curve (AUC) for the models. Finally, the PanelomiX algorithm [22] was used to produce panels of continuous variable cutoffs that maximized the accuracy and sensitivity of the data.

On the other hand, the most frequent disorders in the mimic group were functional neurological disorders (26.2%), migraine (12.3%), vasovagal syncope (11.5%), epilepsy (11.5%), peripheral nerve pathology (7.4%), delirium (6.6%), tumors (6.6%), drug intoxication (5.7%), alcohol intoxication (4.1%), encephalitis (2.5%), traumatic brain injury (1.6%), urinary tract infection (1.6%), hyperglycemia (1.6%) and hypoglycemia (0.8%).

[Table 1.] Clinical characteristics of the cohort and comparisons according to TIA diagnosis

	Mimic (N=131)	TIA (N=103)	p value
<b>Sex</b>			0.654
Female	70 (53.4%)	52 (50.5%)	
<b>Age</b>	60 [46.50-73.00]	74 [65.00-80.50]	< 0.001*
<b>Smoking status</b>	32 (24.4%)	21 (20.4%)	0.464
<b>Arterial Hypertension</b>	69 (52.7%)	77 (74.8%)	< 0.001*
<b>Diabetes Mellitus</b>	30 (22.9%)	29 (28.2%)	0.358
<b>PS*</b>	25 (19.1%)	24 (23.3%)	0.431
<b>Prestroke mRS score</b>	0.47 (0.94%)	0.68 (1.23%)	0.613
<b>Glycemia, mg/dL</b>	112.50 [99.00-138.75]	108.00 [97.00-128.75]	0.131
<b>Dyslipidemia</b>	45 (34.4%)	55 (53.4%)	0.003+
<b>AF*</b>	19 (14.5%)	21 (20.4%)	0.235
<b>Coronary disease</b>	11 (8.4%)	14 (13.6%)	0.202
<b>NIHSS*</b>	1.00 [1.00-2.00]	2.00 [1.00-4.00]	< 0.001*
<b>OTB time, hh:mm</b>	3:15 (6.75-1.29)	3:18 (6.42-1.29)	0.815

The data are presented as n (%) for categorical variables and as medians (interquartile ranges) for continuous variables. \*PS indicates previous stroke. \*AF indicates atrial fibrillation. \*NIHSS National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score was calculated at the onset of the symptoms. OTB time, onset to blood collection time. \*P value <0.001. +P value <0.05.

### Biomarker analysis

Table 2 shows the median values of all biomarkers analyzed in TIA/mimic patients. Of the eight proposed biomarkers, only 4 had significantly higher levels in the comparison groups (mimic vs. TIA patients):

D-dimer [415.71 (ng/mL) (IQR 281.46-929.84) vs. 651.97 (ng/mL) (IQR 354.32-1158.65),  $p \leq 0.026$ ]; endostatin [139.77 (ng/mL) (IQR 109.40-182.18) vs. 175.91 (ng/mL) (IQR 138.38-222.51),  $p \leq 0.001$ ]; NTproBNP [110.08 (pg/mL) (IQR 41.89-370.04) vs. 282.87 (pg/mL) (IQR 102.79-636.08),  $p \leq 0.001$ ];

and VAP-1 [308661.35 (ng/mL) 358613.32 (ng/mL) (IQR (IQR 240385.70-392385.47) vs. 284944.58-438011.30)  $p \leq 0.001$ ].

[Table 2.] Blood biomarkers and comparisons according to TIA and mimic status  
The median (interquartile range) values of the biomarkers within the different groups of

	Mimic (N=131)	TIA (N=103)	p value
<b>Apo-CIII (µg/mL)</b>	149.15 [111.05-263.21]	181.27 [120.60-277.28]	0.164
<b>D-Dimer (ng/mL)</b>	415.71 [281.46-929.84]	651.97 [354.32-1158.65]	0.026*
<b>Endostatin (ng/mL)</b>	139.77 [109.40-182.18]	175.91 [138.38-222.51]	< 0.001*
<b>GroA (pg/mL)</b>	38.69 [20.18-62.49]	29.07 [21.22-57.44]	0.470
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	10.17 [5.33-20.81]	11.35 [8.24-18.26]	0.103
<b>NTproBNP (pg/mL)</b>	110.08 [41.89-370.04]	282.87[102.79-636.08]	< 0.001*
<b>VAP1 (ng/mL)</b>	308661.35 [240385.70-392385.47]	358613.32 [284944.58-438011.30]	0.001*
<b>vWF (%)</b>	123.96 [65.36-221.40]	106.69 [67.70-202.36]	0.440

patients (mimic and TIA) are shown. Apo-CIII, apolipoprotein CIII; GroA, growth-related oncogene- $\alpha$ ; IL, interleukin; NTproBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; VAP-1, vascular adhesion protein-1; vWF, von Willebrand factor. \*P value <0.05.

Correlations between clinical variables and biomarker levels were observed, especially among D-dimer levels ( $p \leq 0.001$ ), NT-proBNP levels and age ( $p \leq 0.001$ ) [Supplemental Figure 1].

Regarding the binary logistic regression analysis results, we constructed the first model (clinical model), which included sex, age, hypertension status, dyslipidemia status, and NIHSS score at admission [Supplemental Table 2]. Then, each biomarker (even if it was not statistically significant according to the univariate analysis) was assessed individually and adjusted for the clinical model. Three biomarkers, Apo-CIII, IL-6, and vWF levels, showed statistical significance in discriminating TIA patients from mimic patients after adjustment for clinical variables. The LRT indicated that adding the following biomarkers to the clinical

model significantly improved the model fit: Apo-CIII [ $p \leq 0.031$ ], IL-6 [ $p \leq 0.030$ ], and vWF [ $p \leq 0.040$ ].

### **ROC analysis**

The discrimination ability (area under the ROC curve) of the model including ApoC-III levels was 0.76; that of the model including IL-6 levels was 0.77; that of the model including vWF levels was 0.76; and that of the clinical model without biomarkers was 0.75. The improvement in terms of the ROC curve was modest when the model with the biomarker and the clinical model without the biomarker were compared [Figure 1].

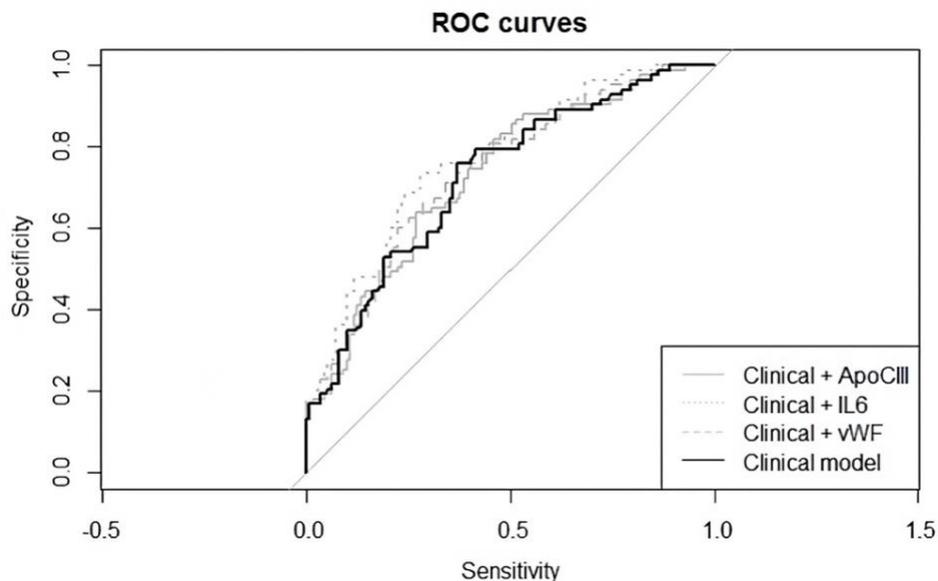


Figure 1. The ability of Apo-CIII, vWF and IL-6 to discriminate clinical models ROC curve: ability to distinguish between TIA and mimics.

In fact, the results of the DeLong test, which compares models, were not significantly different for the models that included ApoC-III and vWF levels. However, the model including IL-6 levels was statistically significant (Table 3- Figure 2). The PanelomiX results (forcing sensitivity) indicated a

cutoff point of  $>132.29$  ng/mL for ApoC-III,  $>132.29\%$  for vWF,  $> 5.45$  pg/mL for IL-6,  $> 4.5$  points for the baseline NIHSS score and  $> 41.5$  years of age. The sensitivity was 100%, and the specificity was 28%, considering the positive prediction of TIA when two or more of these criteria were present.

[Table 3.] De Long test results for the comparison of the AUC of the clinical model vs. clinical model + biomarker levels.

Model	AUC	CI	P value
<b>Clinical model</b>	0.75	0.69, 0.82	-
<b>Clinical model + ApoC-III</b>	0.76	0.70, 0.82	0.81
<b>Clinical model + IL-6</b>	0.77	0.71, 0.83	0.01*
<b>Clinical model + vWF</b>	0.76	0.70, 0.83	0.39

The AUC of the models, the CI of each model and the p value of the comparison of the AUC of the models with those of the DeLong test were calculated. \*P value  $<0.05$ .

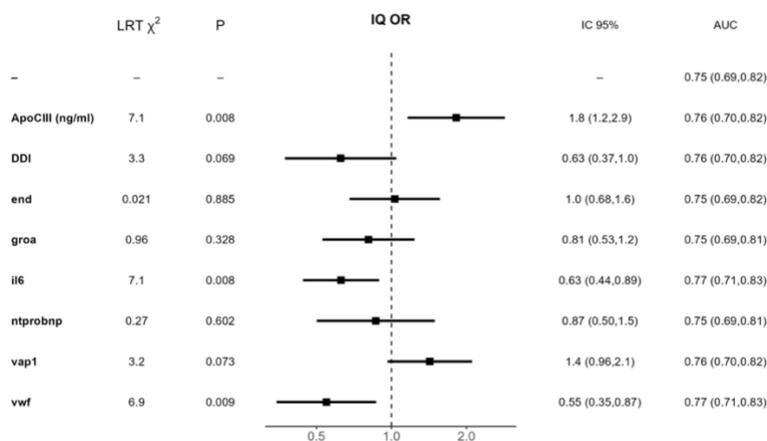


Figure 2. The results of the binary logistic regression analysis; the odds ratios, confidence intervals and p values for the clinical model + each biomarker. In addition, \*LRT indicates the likelihood ratio test, and \*AUC indicates the area under the curve.

### Discussion

This study’s main finding was the identification of Apo-CIII, IL-6, and vWF as potential markers for clinical use in the differential diagnosis of TIAs versus mimics. Although we found proteins, such as NTproBNP and D-dimer, that were significantly elevated among the TIA patients in the comparison of groups, the levels of these proteins were correlated with age. Our results are supported by the work of Muscari et al. [23], which

suggested an association between the NTproBNP protein concentration and age. Similarly, Tita-Nwa et al. found a correlation between D-dimer levels and age [24]. Given that the TIA patients were older than the mimic patients in our cohort, the bivariate results regarding NTproBNP and D-dimer levels could be confounded by age. The results of the multivariable model indicated that the aforementioned markers were not

statistically significant in predicting diagnosis. In contrast, Apo-CIII, IL-6 and vWF levels exhibited more discriminative effects after adjustment for clinical variables. This implies that, regardless of sex, age, hypertension status, dyslipidemia status and NIHSS score, these proteins contribute to differentiation between TIAs and mimics, thereby enhancing the prediction of TIAs.

Several blood biomarkers have been explored in the field of TIA, showing promising results. For example, elevated levels of FABP, Parkinson 7, nucleoside diphosphate kinase A, and ubiquitin fusion degradation protein-1 were found in TIA patients [25] [26] [27]. While markers such as Apo-CIII, IL-6 and vWF have not been explored exclusively in TIA patients, they share pathways with the previously mentioned markers, yielding statistically favorable results in

patients with this transient event. A study focused on atherogenic dyslipidemia in diabetes patients, a significant risk factor for stroke, revealed a strong correlation between increased levels of FABP4 and Apo-CIII, indicating a potential relationship between these two markers and their possible application in the clinical diagnosis [28]. Additionally, FABP and IL-6 proteins has been identified as part of the inflammation process [18].

The markers selected for this study were previously evaluated in the context of stroke. For example, Apo-CIII, which plays a role in lipid metabolism, and has been implicated in promoting the formation of atherosclerotic plaques in blood vessels a critical factor in many strokes, especially ischemic strokes. This suggests a connection between Apo-CIII and the risk factors associated with the diagnosis of TIA [29] [30] [31]. In fact, the study carried out by

Olivieri et al. found that an elevated basal plasma concentration of Apo-CIII is associated with a greater incidence of ischemic cerebrovascular events in cardiovascular patients, leading to the conclusion that the protein may be involved in the prediction of ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) [17]. Our LRT results also indicated the importance of incorporating this protein into the diagnosis of TIA.

On the other hand, IL-6 is naturally produced as part of the body's inflammatory response to various triggers, such as infections and tissue injuries. This inflammatory mechanism may also play a role in TIA as a response to vascular dysfunction and other underlying factors [32]. Additionally, elevated IL-6 levels have been associated with specific vascular risk factors, such as hypertension, diabetes, and atherosclerosis, all of which are

recognized contributors to TIA and other cerebrovascular events [33].

Furthermore, it is important to highlight in that the initial study, IL-6 showed a trend in the group comparison (stroke vs. mimics), with marked significance in the differentiation between ischemic and hemorrhagic stroke. Nonetheless, research on IL-6, a potential prognostic marker of stroke outcomes, has revealed associations with unfavorable outcomes and an increased risk of recurrent events [34] [35].

The results of this study align with previous research, as model comparison tests for predictions (LRT) and the AUC (De Long test) showed statistical significance, indicating a close and potential relationship of IL6 with TIA diagnosis. However, a comprehensive meta-analysis revealed that it is essential to thoroughly evaluate existing

studies on IL-6 and better translate their findings into clinical practice, especially in the context of stroke prognosis [36].

Although notable results for vWF were not obtained in any of the analyses proposed in the original study, different studies have reported a positive relationship between vWF and stroke prediction; the higher the level of this molecule is, the worse the outcome [37] [38]. Similarly, Tobin et al. suggested that elevated levels of this protein in stroke and TIA patients are related to the incidence of vascular events. However, compared to that in the stroke sample, the vWF level in TIA patients did not show statistical significance in the statistical analysis [39].

While vWF has gained interest in stroke research due to its involvement in the vascular system, primarily its role in blood

coagulation and hemostasis, its precise suitability as a biomarker for diagnosing stroke remains uncertain.

It is important to highlight that prior studies have consistently reported that elevated levels of vWF correlate with unfavorable outcomes in stroke recovery and prognosis. However, our study, which uniquely focused on TIA patients, revealed lower vWF levels in TIA patients than in mimic patients. This discrepancy can be attributed to the specific diagnostic focus of our investigation, which differed from that of broader stroke population studies. Furthermore, the collection of blood samples during the acute phase of ischemic events in our study may have yielded different results than studies in which samples were collected during later stages. Additionally, the diverse underlying disorders in the mimic group may account for the observed

lower protein levels, potentially masking the expected elevations in TIA patients. Similarly, the decreased levels in TIA patients may be associated with the brief duration of thrombus in TIA patients, possibly linked to a negative correlation with ADAMTS13 [40] [41]. This underscores the complexity of interpreting protein levels in the context of stroke and highlights the need for further research to unravel these intricate relationships.

Finally, regarding the Panelomix results, it should first be noted that this algorithm works only with continuous variables. Therefore, only continuous variables were included in the determination of the cutoff points. Likewise, the cutoff point with the highest sensitivity was selected because the aim of the study was to predict as many TIAs as possible. However, caution should be exercised when interpreting these cutoff points, as

they were selected specifically for the cohort included in this study.

In conclusion, our study suggested the diagnostic potential of Apo-CIII, IL-6, and vWF for distinguishing TIAs from mimics, with promising initial results. However, the preliminary nature of our findings emphasizes the need for validation of these proteins in different cohorts of TIA patients due to the inherent study limitations. Nonetheless, our findings provide a valuable foundation for further investigations of the role of these proteins in TIA diagnosis. In addition, our research challenges the conventional view that logistic regression should include only statistically significant variables, highlighting the importance of considering correlations with other factors, such as age, which can influence diagnostic predictions. This nuanced approach reflects the complexity of TIA diagnosis and

underscores the importance of ongoing research to advance clinical practice and patient care.

### **Limitations**

This study has several limitations. First, the sample size was small. Second, the results obtained by using the PanelomiX algorithm should be interpreted carefully since the results obtained with this algorithm are specific to the sample used for this study. Finally, the present study was initially not designed for TIA patients. Therefore, the TIA diagnosis was made following each center's clinical standard. Retrospective analysis was performed with the available data and the markers chosen for the original StrokeChip study. One of the main limitations of this study is that the gold standard for diagnosis was the neurologist's diagnosis at each participating center, and acute MRI analysis was not performed.

### **Declarations**

The Neurovascular Research Laboratory of the Vall d'Hebron Research Institute that participates in the Spanish stroke research network RICORS (RD16/0019/00021), received funding from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) DTS14/00004, PI18/00804, and was co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER) for stroke biomarker research. The funders had no role in the study design or conduction.

The StrokeChip study was supported by the research project IDI20130009 (Development, design, and validation of a Laboratory-on-a-chip tool for the early diagnosis of stroke and its differentiation from analogous pathologies) of the Center for the

Development of Industrial Technology (CDTI).

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **References**

1. The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2021 Nov 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

2. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 29];70:1–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5491406/>

3. CONOCES Investigators Group, Alvarez-Sabín J, Quintana M,

Masjuan J, Oliva-Moreno J, Mar J, et al. Economic impact of patients admitted to stroke units in Spain. *Eur J Health Econ* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 22];18:449–58. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10198-016-0799-9>

4. Wafa HA, Wolfe CDA, Emmett E, Roth GA, Johnson CO, Wang Y. Burden of Stroke in Europe. *Stroke* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 25];51:2418–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7382540/>

5. Introducción a los accidentes cerebrovasculares - Enfermedades cerebrales, medulares y nerviosas [Internet]. Man. MSD Versión Para Público Gen. [cited 2021 Nov 10]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-es/hogar/enfermedades-cerebrales,-medulares-y-nerviosas/accidente-cerebrovascular-acv/introducci%C3%B3n-a-los->

accidentes-cerebrovasculares

6. Luengo-Fernandez R, Paul NLM, Gray AM, Pendlebury ST, Bull LM, Welch SJV, et al. A population-based study of disability and institutionalisation after TIA and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke J Cereb Circ* [Internet]. 2013 [cited 2021 May 24];44:2854–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4946627/>

7. Dennis M, Bamford J, Sandercock P, Warlow C. Prognosis of transient ischemic attacks in the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke* [Internet]. 1990 [cited 2021 Oct 28];21:848–53. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.str.21.6.848>

8. Amarenco P, Lavallée PC, Tavares LM, Labreuche J, Albers GW, Abboud H, et al. Five-Year Risk of Stroke after TIA or Minor

Ischemic Stroke. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 19]; Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1802712>

9. Easton J. Donald, Saver Jeffrey L., Albers Gregory W., Albers Mark J., Chaturvedi Seemant, Feldmann Edward, et al. Definition and Evaluation of Transient Ischemic Attack. *Stroke* [Internet]. 2009 [cited 2021 Mar 6];40:2276–93. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.108.192218>

10. Lewandowski CA, Rao CPV, Silver B. Transient Ischemic Attack: Definitions and Clinical Presentations. *Ann Emerg Med* [Internet]. 2008 [cited 2021 May 10];52:S7–16. Available from: [https://www.annemergmed.com/article/S0196-0644\(08\)00832-9/abstract](https://www.annemergmed.com/article/S0196-0644(08)00832-9/abstract)

11. Whiteley WN, Wardlaw JM, Dennis MS, Sandercock PAG.

Clinical scores for the identification of stroke and transient ischaemic attack in the emergency department: a cross-sectional study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2011 [cited 2021 Oct 28];82:1006–10. Available from: <https://jnnp.bmj.com/content/82/9/1006>

12. Nadarajan V, Perry RJ, Johnson J, Werring DJ. Transient ischaemic attacks: mimics and chameleons. *Pract Neurol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 15];14:23–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913122/>

13. Fitzpatrick T, Gocan S, Wang CQ, Hamel C, Bourgoin A, Dowlathshahi D, et al. How do neurologists diagnose transient ischemic attack: A systematic review. *Int J Stroke* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 21];14:115–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>

</articles/PMC6604401/>

14. Bustamante Alejandro, López-Cancio Elena, Pich Sara, Penalba Anna, Giralt Dolors, García-Berrocso Teresa, et al. Blood Biomarkers for the Early Diagnosis of Stroke. *Stroke* [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 15];48:2419–25. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.117.017076>

15. Yuan B, Yang T, Yan T, Cheng W, Bu X. Relationships Between D-Dimer Levels and Stroke Risk as Well as Adverse Clinical Outcomes After Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Nov 14];12:670730. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8215146/>

16. Walia A, Yang JF, Huang Y, Rosenblatt MI, Chang J-H, Azar DT. Endostatin's Emerging Roles

in Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Disease, and Clinical Applications. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 3];1850:2422–38. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624607/>

17. Olivieri O, Cappellari M, Turcato G, Bonetti B, Girelli D, Pizzolo F, et al. Increased Incidence of Ischemic Cerebrovascular Events in Cardiovascular Patients With Elevated Apolipoprotein CIII. *Stroke* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 28];51:61–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.119.026811>

18. Aref HMA, Fahmy NA, Khalil SH, Ahmed MF, ElSadek A, Abdulghani MO. Role of interleukin-6 in ischemic stroke outcome. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 13];56:12. Available from:

<https://doi.org/10.1186/s41983-019-0121-8>

19. Greisenegger S, Segal HC, Burgess AI, Poole DL, Mehta Z, Rothwell PM. Biomarkers and mortality after TIA and minor ischemic stroke: population-based study. *Stroke J Cereb Circ* [Internet]. 2015 [cited 2020 Oct 22];46:659–66. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820048/>

20. Unzeta M, Hernández-Guillamon M, Sun P, Solé M. SSAO/VAP-1 in Cerebrovascular Disorders: A Potential Therapeutic Target for Stroke and Alzheimer’s Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [cited 2023 Nov 14];22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8036996/>

21. Qizilbash N, Duffy S, Prentice CR, Boothby M, Warlow C. Von Willebrand factor and risk of ischemic stroke. *Neurology*.

1997;49:1552–6.

22. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. PanelomiX: A threshold-based algorithm to create panels of biomarkers. *Transl Proteomics* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jun 21];1:57–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212963413000065>
23. Muscari A, Bianchi G, Forti P, Magalotti D, Pandolfi P, Zoli M. N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP): a possible surrogate of biological age in the elderly people. *GeroScience* [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 17];43:845–57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8110633/>
24. Tita-Nwa F, Bos A, Adjei A, Ershler WB, Longo DL, Ferrucci L. Correlates of D-dimer in older persons. *Aging Clin Exp Res* [Internet]. 2010 [cited 2023 Nov 17];22:20–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863304/>
25. Wunderlich MT, Hanhoff T, Goertler M, Spener F, Glatz JFC, Wallesch C-W, et al. Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *J Neurol* [Internet]. 2005 [cited 2021 May 15];252:718–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0725-z>
26. Kamtchum-Tatuene J, JICKLING GC. Blood biomarkers for stroke diagnosis and management. *Neuromolecular Med* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 28];21:344–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722038/>
27. Dolmans LS, Rutten FH, Koenen NCT, Bartelink M-LEL, Reitsma JB, Kappelle LJ, et al. Candidate Biomarkers for the

Diagnosis of Transient Ischemic Attack: A Systematic Review. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 15];47:207–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6878855/>

28. Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* [Internet]. 2008 [cited 2023 Nov 22];49:1746–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520346939>

29. APOC3 apolipoprotein C3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/345>

30. Meyers NL, Larsson M, Vorrjö E, Olivecrona G, Small

DM. Aromatic residues in the C terminus of apolipoprotein C-III mediate lipid binding and LPL inhibition. *J Lipid Res*. 2017;58:840–52.

31. Pechlaner R, Tsimikas S, Yin X, Willeit P, Baig F, Santer P, et al. Very-Low-Density Lipoprotein-Associated Apolipoproteins Predict Cardiovascular Events and Are Lowered by Inhibition of APOC-III. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Dec 28];69:789–800. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5314136/>

32. Villar-Fincheira P, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R, et al. Role of Interleukin-6 in Vascular Health and Disease. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 2];8:641734. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8004548/>

33. Papadopoulos A, Palaiopoulos K, Björkbacka H, Peters A, de Lemos JA, Seshadri S, et al. Circulating Interleukin-6 Levels and Incident Ischemic Stroke. *Neurology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 13];98:e1002–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8967391/>
34. Pawluk H, Grzešek G, Kołodziejaska R, Kozakiewicz M, Woźniak A, Grzechowiak E, et al. Effect of IL-6 and hsCRP Serum Levels on Functional Prognosis in Stroke Patients Undergoing IV-Thrombolysis: Retrospective Analysis. *Clin Interv Aging* [Internet]. 2020 [cited 2023 Oct 2];15:1295–303. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418453/>
35. Smith CJ, Emsley HCA, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*. 2004;4:2.
36. McCabe J, O'Reilly E, Coveney S, Collins R, Healy L, McManus J, et al. Interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen, and risk of recurrence after ischaemic stroke: Systematic review and meta-analysis. *Eur Stroke J* [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 2];6:62–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7995315/>
37. Bongers TN, de Maat MPM, van Goor M-LPJ, Bhagwanbali V, van Vliet HHDM, Gómez García EB, et al. High von Willebrand Factor Levels Increase the Risk of First Ischemic Stroke. *Stroke* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jun 8];37:2672–7. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.str.0000244767.39962.f7>

38. Wieberdink RG, van Schie MC, Koudstaal PJ, Hofman A, Wittteman JCM, de Maat MPM, et al. High von Willebrand Factor Levels Increase the Risk of Stroke. *Stroke* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jun 8];41:2151–6. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.110.586289>

39. Tobin WO, Kinsella JA, Kavanagh GF, O'Donnell JS, McGrath RT, Tierney S, et al. Profile of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor propeptide in an overall TIA and ischaemic stroke population and amongst subtypes. *J Neurol Sci* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 20];375:404–10. Available from: [https://www.jns-journal.com/article/S0022-510X\(17\)30141-7/fulltext](https://www.jns-journal.com/article/S0022-510X(17)30141-7/fulltext)

40. Buchtele N, Schwameis M, Gilbert JC, Schörghofer C, Jilka B. Targeting von Willebrand Factor in Ischaemic Stroke: Focus on Clinical Evidence. *Thromb*

*Haemost* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jun 10];118:959–78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6193403/>

41. McCabe DJH, Murphy SJX, Starke R, Harrison P, Brown MM, Sidhu PS, et al. Relationship between ADAMTS13 activity, von Willebrand factor antigen levels and platelet function in the early and late phases after TIA or ischaemic stroke. *J Neurol Sci* [Internet]. 2015 [cited 2022 May 20];348:35–40. Available from: [https://www.jns-journal.com/article/S0022-510X\(14\)00703-5/fulltext#relatedArticles](https://www.jns-journal.com/article/S0022-510X(14)00703-5/fulltext#relatedArticles)

## Supplemental data

## Methods I

**Table 1** Methods of biomarker measurement, material, dilution and units

<b>Biomarker</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Reference</b>	<b>Dilution</b>	<b>LLOQ</b>	<b>Units</b>
<b>ApoCIII</b>	Abnova	KA0465	1/2500	0.002	µg/mL
<b>D-Dimer</b>	Stago	947	1/42	10	ng/mL
<b>Endostatin</b>	R&D	RYD-DNST0	1/50	0.023	ng/mL
<b>GroA</b>	Aushon 3-plex	85,723	1/2	0.39	pg/mL
<b>IL6</b>	Aushon 3-plex	85,723	1/2	0.20	pg/mL
<b>NTPROBNP</b>	Roche	4,842,464	1/1	5	pg/mL
<b>VAP1</b>	eBioscience	BMS259TEN	1/1000	0.019	ng/mL
<b>VWF</b>	Stago	942	1/102	1	%

LLOQ: lower limit of quantification; ApoCIII: apolipoprotein CIII; GroA: growth-related oncogen alpha; IL-6: interleukin-6; NTproBNP: N-terminal pro B-type natriuretic peptide; VAP-1: vascular adhesion protein-1; vWF: Von Willebrand factor.

Table 2 Results of the binary logistic regression analysis that evaluated the diagnostic value of clinical variables.

Variable	Clinical Model		
	OR	[95% CI]	p value
Sex	0.585	(0.30;1.10)	0.103
Age	1.032	(1.00;1.05)	0.011 <sup>+</sup>
Hypertension	1.059	(1.47;2.35)	0.886
Dyslipidemia	1.618	(0.83;3.16)	0.156
NIHSS at admission	1.368	(1.12;1.72)	0.003 <sup>+</sup>
ROC curve	<b>AUC</b>	<b>[95% CI]</b>	
	0.72	(0.65;0.79)	

The table shows the results of the clinical model as well as the odd ratios, the confidence interval and the p value for variables. \*LRT indicates likelihood- ratio test \*AUC indicates area under the curve. <sup>+</sup>P value <0.05.

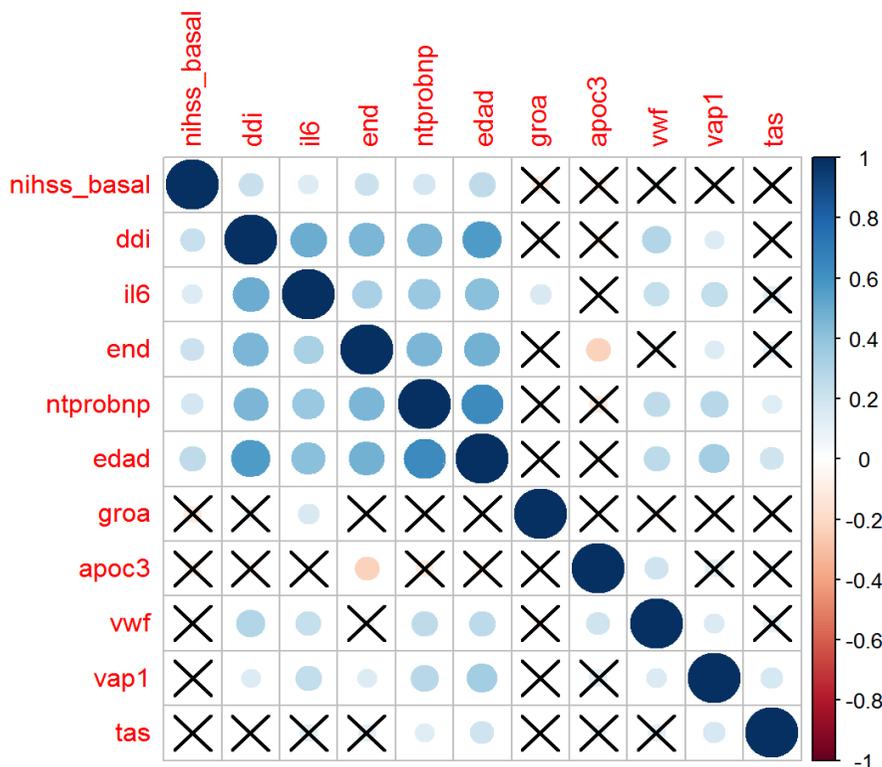


Figure 1. Correlation between clinical variables (age, tas) and biomarkers. ApoCIII: apolipoprotein CIII; GroA: growth-related oncogen alpha; IL-6: interleukin-6; NTproBNP: N-terminal pro B-type natriuretic peptide; VAP-1: vascular adhesion protein-1; vWF: Von Willebrand factor. Tas: Blood pressure

## DISCUSIÓN

A lo largo de esta tesis se han abordado las dificultades inherentes al diagnóstico de un AIT. Sin duda una de las principales complicaciones radica en la propia definición, que oscila entre una perspectiva temporal y otra perspectiva que, aunque considera el tiempo, está centrada en la ausencia del daño tisular. La naturaleza transitoria de los síntomas, que suelen desaparecer en cuestión de minutos, obstaculiza considerablemente el diagnóstico y hace que, en muchos casos, esta dependa en gran medida de la evaluación clínica del facultativo que atiende al paciente.

La imposibilidad de realizar rutinariamente estudios de neuroimagen sensible, sumada a la alta prevalencia de las condiciones que imitan síntomas del AIT (conocidas como “*mimics*”), complica aún más el proceso diagnóstico. El elevado coste de las pruebas de neuroimagen de alta resolución para detectar pequeños cambios en el cerebro hace inviable su uso sistemático y rutinario en la evaluación y el diagnóstico del AIT. No obstante, en varios estudios se ha sugerido su utilidad para descartar ictus isquémicos.

A pesar de las dificultades diagnósticas, la detección temprana del AIT representa una oportunidad crucial para prevenir futuros ictus, ya que este evento vascular, aunque es transitorio, se considera una señal de alerta. Esta tesis tiene como objetivo mejorar el diagnóstico temprano y preciso del AIT con la ayuda de biomarcadores, con la intención de optimizar las estrategias futuras de prevención primaria y secundaria del ictus.

### 5.1 Biomarcadores para la evaluación de la isquemia cerebral

Como se ha mencionado previamente, uno de los problemas en el diagnóstico de AIT es que muchas veces los síntomas desaparecen durante la evaluación

médica. Por ello, gran parte de la investigación de biomarcadores vasculares se ha centrado en los procesos tardíos de la cascada isquémica (fase aguda del ictus), ya que las muestras del paciente se obtienen después de que los síntomas hayan pasado [71]. Otra de las razones por las que los biomarcadores se miden en esta fase se debe a que algunos estudios han sugerido que los marcadores tienden a estabilizarse en la fase aguda, por lo que son detectables con mayor fiabilidad en comparación con la fase hiperaguda. Además en esta primera fase, los biomarcadores pueden cambiar rápidamente o no llegan a expresarse en su totalidad, lo que conduciría potencialmente a resultados falsos [79] [80].

En los últimos años, la proteína de unión a ácidos grasos cardíacos (HFABP, por sus siglas en inglés - Heart fatty-Acid Binding Protein) se ha perfilado como un nuevo biomarcador prometedor para el diagnóstico precoz del ictus. Esto se debe a su elevación rápida y sostenida tras la aparición de los síntomas, además de su capacidad para diferenciar entre lesiones cerebrales [81].

Por otro lado, a lo largo del tiempo se ha propuesto el estudio de marcadores proteicos de origen tanto cerebral como no cerebral por su posible utilidad en el diagnóstico de ictus y/o AIT. Varias proteínas de origen no cerebral han demostrado su valor potencial para mejorar el diagnóstico del ictus. A partir de esto se evaluó un panel de ocho proteínas que están estrechamente relacionadas con AIT, las cuales fueron las siguientes: dímero D, endostatina, apolipoproteína CIII (ApoC-III), oncogén- $\alpha$  relacionado con el crecimiento (GROA), interleucina (IL6), N -péptido natriurético pro-terminal tipo B (NTproBNP), proteína de adhesión vascular-1 (VAP-1) y von Willebrand factor (vWF).

En este contexto, el objetivo de la investigación en la presente tesis ha sido estudiar si los biomarcadores antes expuestos podrían ayudar a mejorar el diagnóstico del AIT, con vistas a mejorar las estrategias de prevención tanto primaria como secundaria. En esta sección se desglosarán los resultados antes expuestos para mejor comprensión del lector.

### 5.2 H-FABP como biomarcador en el diagnóstico preciso del AIT

#### 5.2.1 H-FABP

La proteína de unión a ácidos grasos de tipo cardíaco (H-FABP), también conocida como FABP3, es una proteína relativamente pequeña presente en el citoplasma de los miocitos cardíacos en concentraciones más altas que en las células del músculo esquelético. Esta proteína participa en el transporte intracelular de ácidos grasos de células endoteliales lesionadas y cuerpos celulares neuronales, y se expresa en varios tejidos, especialmente el corazón y el cerebro. A lo largo del tiempo, H-FABP ha sido ampliamente estudiada en el infarto de miocardio y, en la actualidad, es un biomarcador reconocido para esta afección [82] [83].

Por otro lado, se ha establecido que H-FABP, junto con otros subtipos de FABP como FABP4, FABP5 y FABP7, son funcionales en diferentes tipos de células de la unidad neurovascular del cerebro. Estas proteínas responden activamente a la cascada isquémica y pueden agravar colectivamente el daño isquémico del tejido cerebral. Además, se ha postulado que, debido a que esta molécula aumenta a las pocas horas del inicio de un episodio isquémico, podría permitir una detección más precoz del ictus isquémico en comparación con otros biomarcadores [84].

En esta línea encontramos el estudio realizado por Wunderlich et al., en el cual se informa que las concentraciones séricas de H-FABP alcanzan su punto máximo 2 a 3 horas después del inicio del ictus y permanecen elevadas hasta 120 horas después del evento. Los resultados indicaron que las concentraciones tempranas de esta proteína se asocian con la gravedad de los déficits neurológicos y los resultados funcionales. Además, se plantea que la liberación elevada de la molécula se asocia con el tamaño del infarto en la TC. Considerando que esta proteína juega un rol trascendente en el proceso de isquemia [85].

### 5.2.2 H-FABP en el contexto de la neuroimagen

El estudio realizado por Laggebert obtuvo resultados que indican que el papel de esta proteína en la diferenciación entre pacientes con traumatismo craneoencefálico leve y presencia o ausencia de lesión cerebral (TAC positivos y negativos) puede ser de gran importancia. En este estudio, se midieron diferentes proteínas y los resultados mostraron que, de todos los marcadores estudiados, H-FABP obtuvo los mejores resultados estadísticos. Además, se encontró que los niveles más altos de esta proteína estaban relacionados con el grupo que presentaba daño cerebral (TC-positivo) con una sensibilidad del 100% [81] [86]. De este modo, nuestra hipótesis fue que podríamos obtener resultados similares en pacientes con AIT.

Aunque el AIT se considera un evento transitorio que no causa daño cerebral, algunos estudios han demostrado que existen cambios isquémicos incluso en pacientes con síntomas breves. Las cifras oscila entre el 30% de los pacientes con síntomas de menos de una hora y el 51,1% de los pacientes con más de 6 horas presentan cambios isquémicos en estudios de DWI [87] [88]. Por tanto,

los estudios de neuroimagen en pacientes con AIT son de gran importancia. Sin embargo, este tipo de estudios no están disponibles en todos los hospitales debido a su alto costo, por lo que contar con una alternativa más económica sería muy beneficioso.

Bajo esta perspectiva se propuso el uso del POCT, que es más accesible y económico. Además, su implementación no se limita estrictamente a un hospital, sino que también se puede extrapolar a centros de salud y/o ambulancias. A pesar de que el uso del POCT claramente representa ventajas, su uso no es muy común y las razones de esta baja implementación no están completamente claras.

Considerando lo anterior, uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar si el POCT es lo suficientemente sensible para distinguir daño tisular (DWI positivo frente a DWI negativo) entre pacientes inicialmente diagnosticados como AIT (bajo el criterio temporal), y su posible implementación en la clínica. Sin embargo, nuestros resultados no alcanzaron significancia estadística en ninguno de los análisis propuestos. Aunque en la comparación de grupos se observó una tendencia (niveles elevados de H-FABP en pacientes con daño tisular), esta no fue significativa. Finalmente, la predicción del AUC fue moderada, lo que sugiere que podría ser necesario un tamaño de muestra mayor para obtener resultados sólidos.

### 5.2.3 H-FABP en el AIT

Las investigaciones centradas en indagar el valor de HFABP en los eventos vasculares se han enfocado casi exclusivamente en el ictus isquémico. Los resultados en este campo indican que esta proteína medida en plasma no son

lo suficientemente sensibles para discriminar entre el grupo ictus y el control. Sin embargo, la combinación de H-FABP e IL-6 mejora significativamente la predicción de la recurrencia de un ictus [89] [90].

Por otro lado, los resultados séricos indican que se pueden encontrar niveles elevados de H-FABP hasta 24 h después del evento vascular en la mayoría de los casos (80% de los casos de ictus). Y hasta 5 días después del inicio del ictus y cabe destacar que los niveles más altos se encuentran sólo en las primeras horas. Asimismo, se indica que los niveles de esta proteína en AIT son menores en comparación con un ictus establecido. Curiosamente, los pacientes con valores más altos de H-FABP mostraron un mayor volumen de daño cerebral [72] [91].

Sólo se ha encontrado un estudio focalizado en AIT. En este estudio llevado a cabo por Dolmans et al.; [92], encontraron que dentro del panel de biomarcadores que midieron, el único marcador que obtuvo un valor significativo para diferenciar entre AIT versus ictus menor fue H-FABP ( $p = 0,05$ ). Sin embargo, no obtuvieron resultados sustanciales en la regresión logística ni en el análisis multivariado.

Pese a esto, tenemos resultados diferentes en nuestra investigación. Según nuestros resultados, la proteína podría diferenciar entre el AIT vs el evento no vascular (*Mimic*). Asimismo, los resultados de la regresión logística señalan la significancia estadística en la asociación del marcador con el diagnóstico final. Además, cuando comparamos el modelo, los resultados de la prueba de razón de verosimilitud (LRT) indican que la inclusión de la proteína en el modelo es relevante para la predicción final (TIA vs *Mimic*). Sin embargo, una

comparación más restrictiva entre el AUC de los modelos (prueba de DeLong) no arrojó resultados significativos.

Las diferencias encontradas entre nuestro estudio y el realizado por Dolmas et al; son básicamente dos: la primera discrepancia está en los grupos de comparación utilizados y el segundo en el método de medición del biomarcador. Al comprar eventos vasculares vs no vasculares, nuestro estudio parece detectar asociaciones que el otro estudio no detectó. Además, el uso del POCT puede influir en la sensibilidad y la especificidad de los resultados. En este escenario, es importante subrayar la importancia de considerar el contexto específico de cada estudio a la hora de interpretar los datos obtenidos y tener en cuenta que estos resultados son preliminares y necesitan ser validados en investigaciones futuras con un tamaño muestral más amplio.

### 5.2.4 Uso de técnicas POCT

El uso de POCT para medir marcadores juega un papel crucial en la atención primaria, los departamentos de emergencia y los servicios prehospitalarios. Además, proporciona información valiosa para respaldar las decisiones sobre el tratamiento y la derivación a atención secundaria [93].

En el caso de los servicios de urgencias y de atención primaria, la sobrepoblación de pacientes provoca largos tiempos de espera, retrasos en el tratamiento y, en consecuencia, un aumento en las tasas de mortalidad [94]. La implementación del POCT podría reducir sustancialmente este tiempo de espera al obtener resultados confiables y rápidos, evitar derivaciones innecesarias a atención especializada o secundaria y mejorar los resultados del tratamiento. Por otro lado, los resultados del POCT se obtienen de manera más

rápida en comparación con los ELISA y otras pruebas de laboratorio. Todo esto mejora la calidad de la atención de emergencia prehospitalaria y hospitalaria, iniciando y guiando las decisiones tempranas de diagnóstico y tratamiento [95] [96]. Se están incluso desarrollando pruebas rápidas de POCT para algunas de las moléculas de interés de esta tesis (como FABP) que pueden ser medidos cuantitativamente usando la cámara del smartphone como lector.

En concreto, los estudios de Lahr et al. y Weber et al. han demostrado la relevancia y la eficacia del uso de POCT en el tratamiento del ictus y en la toma de decisiones sobre la administración en la terapia de trombólisis. Esto es de suma importancia ya que los retrasos en los resultados de laboratorio son uno de los principales obstáculos para el inicio temprano de la terapia trombolítica [97] [98].

### 5.2.5 Limitaciones y perspectivas de futuro

El presente estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, se utilizó una muestra pequeña, especialmente en la medición de la cohorte de DWI. En segundo lugar, la poca información recopilada por paciente y la información faltante sobre infarto de miocardio e isquemia coronaria aguda podrían jugar un papel importante en los resultados que obtuvimos, ya que este biomarcador está estrechamente relacionado con la enfermedad coronaria. En tercer lugar, los resultados obtenidos mediante el uso de PanelomiX deben interpretarse cuidadosamente para extrapolarlos a una muestra diferente. Cuarto, el presente estudio no fue diseñado inicialmente para la evaluación de AIT. Por lo tanto, algunos de los datos importantes, como el tiempo de duración de los síntomas, no están disponibles. Finalmente, aunque todas las muestras tuvieron el mismo periodo de almacenamiento al momento de la medición de la molécula parte

del material tuvo largos períodos de almacenamiento, que de alguna manera podrían afectar los valores de FABP, pero esto es algo que no hemos estudiado adecuadamente.

Finalmente, disponer de un biomarcador preciso y sencillo que permita el diagnóstico de AIT nos ayudaría en el diagnóstico diferencial. Además, el uso de técnicas de POCT para medir el marcador mejoraría y optimizaría la dirección adecuada del tratamiento. Desde nuestro punto de vista, estos resultados abren una posibilidad para mejorar el manejo de esta patología. Niveles más altos de este marcador podrían ayudar a reducir las discrepancias diagnósticas en pacientes con sospecha clínica de AIT en comparación con los imitadores, considerando que se ha comprobado que se encuentran niveles elevados de H-FABP en este tipo de pacientes vasculares. Aunque nuestros resultados son preliminares para trasladar su uso a la clínica, debido al potencial que muestra este marcador valdría la pena explorarlo en una cohorte más amplia.

### 5.3 Panel de Biomarcadores en el contexto del AIT

#### 5.3.1 Papel de ApoC-III en el AIT

Para empezar, es necesario aclarar que el análisis estadístico de este estudio fue exploratorio. Por lo tanto, se consideró necesario realizar un análisis exhaustivo de todas las proteínas, razón por la cual se incluyeron todas las moléculas en una regresión logística para evitar sesgos estadísticos de correlación con las variables clínicas. Esto lleva a que los resultados, a primera vista, parezcan contradictorios, ya que las proteínas que alcanzan significancia estadística en el análisis estadístico inicial (comparación de grupos) finalmente no son incluidas en el modelo final.

Por otra parte, las proteínas ApoC-III, IL6 y vWF, que no alcanzaron significancia estadística en el análisis inicial, se perfilan como biomarcadores prometedores para el diagnóstico del ictus.

Estos resultados se entienden mejor si observamos el gráfico de correlaciones, el cual indican que las proteínas que alcanzan significación estadística en el análisis univariante están estrechamente correlacionadas con la edad. Al examinar los datos clínicos de nuestra muestra, queda claro que el grupo AIT es de mayor edad en comparación con el grupo *Mimic*, que es más joven. Por lo tanto, las proteínas que alcanzaron significancia estadística en este primer análisis (univariante) parecen reflejar la edad de los pacientes y no tanto el diagnóstico final.

En consecuencia, es lógico que en la regresión logística estos marcadores no alcancen significación estadística porque compiten con la edad, que es un mejor predictor de AIT. Así, se puede asumir que las proteínas que presentan significación estadística en la regresión logística tienen cierta independencia con las variables clínicas incluidas en el modelo y por tanto aportan nueva información al diagnóstico final de AIT, como es el caso de la molécula ApoC-III.

Este biomarcador (ApoC-III) es una proteína que desempeña un rol crucial en el metabolismo de los lípidos y se ha ve implicada en la promoción de la formación de placas ateroscleróticas en los vasos sanguíneos, el cual es un factor subyacente crítico en muchos ictus, por lo que se ha relacionado con un mayor riesgo de ictus isquémico y AIT [99] [100] [101]. En este sentido, los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo por Olivieri et al. sugirieron que una concentración plasmática basal elevada de esta molécula está

relacionada con la predicción de ictus isquémico o AIT [102]. Los resultados obtenidos en nuestro estudio se relacionan con lo mencionado hasta aquí, ya que el p-valor del LRT indica la importancia de incorporar esta proteína en el diagnóstico clínico del AIT.

Aunque no se comprenden completamente los mecanismos exactos por los cuales ApoC-III contribuye a este mayor riesgo, la evidencia actual sugiere que su papel en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) es un factor clave [103] [104]. Además, participa en la acumulación de lípidos en el torrente sanguíneo y promueve la formación de placas ateroscleróticas [105]. Esta asociación indica la importancia de esta molécula como predictor de ictus y subraya su potencial como diana terapéutica. En este contexto, nuestros resultados muestran que la capacidad para predecir un AIT, representada por el valor de AUC, es modesta, con un valor de 0,76 (IC: 0,70-0,82). Esto significa que, aunque la proteína tiene cierta capacidad predictiva, esta no es extremadamente alta.

Además, cuando se incluye esta proteína en el modelo clínico, que por sí solo tiene un AUC de 0,75 (IC: 0,69-0,82), observamos una ligera mejora en la discriminación de casos. Lo que es congruente con los resultados obtenidos en el test de comparación de AUC, ya que los valores de la prueba De Long indican que esta mejora en la capacidad predictiva no es suficientemente significativa desde un punto de vista estadístico.

### 5.3.2 Papel de IL6 y vWF en el AIT

Las proteínas IL6 y vWF desempeñan un papel importante en las complicaciones trombóticas y tromboembólicas, que se asocian con el ictus isquémico agudo y el AIT.

Por un lado, la IL6 es una citocina proinflamatoria que contribuye significativamente a la trombosis, mediante la inducción del factor tisular (FT). En este sentido, se han reportado niveles elevados de IL6, TF y vWF, en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda, particularmente en aquellos con mal pronóstico; lo que sugiere un mayor riesgo a largo plazo de un ictus isquémico así como con la predicción de peores resultados [106] [107] [108] [109].

Por ejemplo, un estudio de interés sobre ictus indica que los niveles de IL6 fueron significativamente más altos en pacientes con recurrencia que en aquellos sin recurrencia, con una correlación positiva estadísticamente significativa entre esta proteína con la mortalidad, NIHSS y mRS después de 3 meses y un AUC de 0,9. Esto sugiere que la IL6 es un biomarcador que contribuye a determinar el resultado clínico del ictus isquémico y predecir la recurrencia [109].

Aunque existen algunos estudios que abordan el papel de esta molécula en los resultados pronósticos del ictus isquémico, hay pocos estudios recientes que evalúen esta proteína en el diagnóstico. Los resultados de los estudios enfocados en el diagnóstico generalmente indican niveles elevados de IL6 en todos los pacientes con ictus en comparación con el grupo control. Sin embargo, análisis más complejos sugieren que esta proteína puede no ser un biomarcador potencial para el diagnóstico de un ictus establecido [110] [77].

Por el contrario, nuestros resultados indican lo que esta proteína es potencialmente un marcador que puede ayudar a mejorar el diagnóstico, al menos en pacientes AIT. Aunque en el análisis univariante que la diferencia entre los niveles, de esta proteína, no son estadísticamente significativos, se puede observar valores más altos en el grupo de AIT en comparación con el imitador. Asimismo, los resultados de nuestros análisis más complejos indican que esta proteína puede ser un marcador potencial para el diagnóstico diferencial de AIT. Resultados que se ven respaldados con los obtenidos en el LRT que indican que el modelo que incluye esta proteína predice mejor el diagnóstico que el modelo clínico por sí solo.

Del mismo modo, los resultados de la prueba de DeLong indican una mejora significativa del AUC cuando se incluye IL6. Pese a esto, es necesario recordar que nuestros hallazgos son preliminares y deberían ser estudiados de forma más exhaustiva y validados en futuras investigaciones con una muestra más amplia.

Por otro lado, el vWF es un mediador de la inflamación vascular, activando varias vías inflamatorias, incluida la cascada del complemento y la NETosis. [111]. En la actualidad se sabe que la interacción de esta proteína con las plaquetas y la respuesta inflamatoria es crucial en la progresión del ictus isquémico. Por otra parte, se ha demostrado que los niveles elevados de esta molécula están asociados con una mayor infiltración de neutrófilos, expresión de citocinas inflamatorias y empeoramiento de los resultados neurológicos en los modelos animales de ictus isquémico [112].

Al igual que las proteínas expuestas hasta hora, el vWF no mostró diferencias significativas en el análisis inicial. Sin embargo, es llamativo que los niveles

más altos de esta molécula se encuentren en el grupo control (*Mimic*). Ya que estudios anteriores han informado consistentemente que los niveles elevados de vWF se correlacionan con resultados desfavorables en la recuperación y el pronóstico del ictus. No obstante, nuestro estudio, centrado en pacientes con AIT, reveló un patrón opuesto: niveles más bajos de vWF en pacientes con AIT que en *mimics*.

Esta discrepancia podría explicarse por varias razones. En primer lugar, nuestro enfoque diagnóstico se centró específicamente en pacientes con AIT, lo cual difiere de estudios más amplios que incluyen pacientes con ictus agudos. Por otro lado, la presencia de diversas patologías en el grupo control (intoxicación, tumores, etc.) podría explicar los niveles más altos de vWF en este grupo. En contraste, los valores reducidos en el grupo AIT podrían estar relacionados con la corta duración de la oclusión por un trombo, posiblemente debido a la correlación negativa con ADAMTS13 [113] [114]. Por último, aunque los análisis estadísticos sugieren que incluir el vWF en el modelo podría mejorar el diagnóstico de AIT, el aumento en la capacidad de discriminación del modelo no resultó estadísticamente significativo.

### 5.3.3 Otros biomarcadores en AIT

La respuesta celular del sistema nervioso central (SNC) al ictus conduce a la liberación de marcadores neuronales específicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el torrente sanguíneo, lo que indica daño cerebral. De este modo, los biomarcadores propuestos para evaluar AIT se han centrado en su aplicación diagnóstica y pronóstica. Muchos de estos biomarcadores propuestos no son específicos del cerebro, sino que están relacionados con el proceso de isquemia, la coagulación o la inflamación, como es el caso del dímero D, la

endostatina, el oncogén  $\alpha$  relacionado con el crecimiento (GROA), el péptido natriurético pro-tipo B N-terminal (NTproBNP), la proteína de adhesión vascular-1 (VAP-1), entre otros. Se ha argumentado que estos marcadores, estrechamente relacionados con el evento vascular, proporcionan información valiosa sobre los mecanismos de lesión cerebral, incluyendo el papel de la inflamación en el núcleo y las áreas circundantes del infarto.

Por ejemplo, la endostatina es conocida por su capacidad para inhibir la angiogénesis e inducir la apoptosis. Niveles más elevados de esta proteína se han asociado con daño vascular, peor pronóstico y mayor mortalidad en pacientes con eventos cardiovasculares [115].

Por otro lado, el caso del dímero D es un claro ejemplo de marcador no específico del cerebro considerado muy potente para la degradación de proteínas intravasculares [116]. En la práctica clínica, los niveles plasmáticos anormales de dímero D son indicadores esenciales de coagulación intravascular diseminada, y los niveles bajos a menudo ayudan a descartar eventos críticos como embolia pulmonar y trombosis venosa profunda [117]. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que evalúen el papel del dímero D en el riesgo de resultados clínicos adversos después de un ictus. En resumen, el dímero D es valioso en el diagnóstico del ictus, con evidencia sólida en esa área, aunque la evidencia sobre su pronóstico ha sido inconsistente hasta ahora.

Del mismo modo, se ha registrado que el papel de la molécula NT-poBNP puede ser determinante en la predicción del riesgo de un ictus tras un AIT. Se ha propuesto que los niveles de este marcador, determinado durante las

primeras horas, se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de ictus posterior (OR:6,65) [118].

En resumen, la identificación y evaluación de estos y otros biomarcadores ofrecen perspectivas valiosas sobre los mecanismos subyacentes de la lesión cerebral y la inflamación asociada, destacando su relevancia tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de los pacientes con AIT. La inclusión de estos marcadores en protocolos clínicos podría mejorar significativamente la atención y los resultados en estos pacientes, subrayando la necesidad de continuar la investigación en esta área.

### 5.3.4 Limitaciones y perspectivas de futuro

Si bien se han logrado avances significativos en la identificación de biomarcadores como ApoCIII, IL-6 y vWF para AIT, existen varias limitaciones en la investigación actual que deben abordarse. En primer lugar, el pequeño tamaño muestral. En segundo lugar, los resultados obtenidos mediante el algoritmo PanelomiX deben interpretarse cuidadosamente ya que los resultados obtenidos con este algoritmo son específicos de la muestra utilizada para este estudio. Finalmente, el presente estudio no fue diseñado inicialmente para pacientes con AIT. Por tanto, el diagnóstico de AIT se realizó siguiendo el estándar clínico de cada centro. Por lo que una de las principales limitaciones de este estudio es que el estándar de oro para el diagnóstico de AIT fue el criterio clínico del neurólogo en cada centro participante y no se contrastó el diagnóstico con un análisis de resonancia magnética aguda. Finalmente, para llevar a cabo este subestudio se realizó un análisis retrospectivo con los datos disponibles y los marcadores elegidos para el estudio original (StrokeChip).

Las investigaciones futuras deberían centrarse en fortalecer nuestras limitaciones en estudios longitudinales y con una muestra más grande. Una mayor validación de ApoC-III, IL-6 y vWF como biomarcadores de AIT a través de estudios a gran escala podría solidificar su valor diagnóstico y pronóstico.

Finalmente, concluimos que el desarrollo de paneles integrales de biomarcadores que incluyan proteínas tanto específicas del cerebro como aquellas relacionados con la isquemia puede proporcionar una comprensión más profunda de este evento vascular y mejorar los resultados clínicos.

## **CONCLUSIONES**

Las conclusiones de esta tesis doctoral son las siguientes:

- Se han encontrado mayores niveles de H-FABP en pacientes con daño tisular al realizarles una resonancia cerebral (DWI positiva) que en pacientes sin daño tisular (DWI negativa). El poder de predicción de esta proteína fue moderado ya que los resultados son alentadores, el tamaño muestral es muy pequeño.
- Se ha encontrado mayor concentración sérica de H-FABP en pacientes con AIT que en pacientes imitadores (*Mimics*). Asimismo, en el modelo final se observó una asociación entre la proteína y el diagnóstico final después de ajustar el modelo por edad e hipertensión (variables confusoras). Estos resultados podrían señalar el potencial del biomarcador en el diagnóstico clínico. Finalmente, la existencia de pruebas rápidas para este biomarcador permitirá probar el valor clínico de esta molécula en la vida real, implementándolo en el departamento de emergencias o en el consultorio del médico de cabecera.
- El estudio del panel de biomarcadores de la presente tesis indica que los biomarcadores sanguíneos Apo-CIII, IL-6 y VWF pueden mejorar significativamente el diagnóstico precoz del AIT, diferenciándolo de otras afecciones que imitan sus síntomas. Pese a esto, es necesario validar estos resultados en futuras investigaciones superando las limitaciones del propio estudio.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Rosner, J., Reddy, V., & Lui, F. (2022). Neuroanatomy, Circle of Willis. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534861/>
2. WSO Global Stroke Fact Sheet 2022. (n.d.). *World Stroke Organization*. Retrieved October 19, 2022, from <https://www.world-stroke.org/news-and-blog/news/wso-global-stroke-fact-sheet-2022>
3. Feigin, V. L., Brainin, M., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Hacke, W., ... Lindsay, P. (2022). World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *International Journal of Stroke*, *17*(1), 18–29. <https://doi.org/10.1177/17474930211065917>
4. Wafa, H. A., Wolfe, C. D. A., Emmett, E., Roth, G. A., Johnson, C. O., & Wang, Y. (2020). Burden of Stroke in Europe. *Stroke*, *51*(8), 2418–2427. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029606>
5. Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., & Nichols, M. (2016). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European Heart Journal*, *37*(42), 3232–3245. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw334>
6. Rizos, T., Jüttler, E., Sykora, M., Poli, S., & Ringleb, P. A. (2011). Common disorders in the neurological emergency room – experience at a tertiary care hospital. *European Journal of Neurology*, *18*(3), 430–435. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03170.x>
7. Teo, K. K., & Rafiq, T. (2021). Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Canadian Journal of Cardiology*, *37*(5), 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2021.02.009>
8. Boehme, A. K., Esenwa, C., & Elkind, M. S. V. (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation research*, *120*(3), 472–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>
9. Cai, W., Zhang, K., Li, P., Zhu, L., Xu, J., Yang, B., ... Chen, J. (2017). Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: an aging effect. *Ageing research reviews*, *34*, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.006>
10. Sohrabji, F., Okoreeh, A., & Panta, A. (2019). Sex hormones and stroke: beyond estrogens. *Hormones and behavior*, *111*, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.10.010>
11. INEbase / Sociedad /Salud /Estadística de defunciones según la causa de muerte / Últimos datos. (n.d.). *INE*. Retrieved November 7, 2022, from [https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175](https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175)
12. Moraes, M. de A., de Jesus, P. A. P., Muniz, L. S., Costa, G. A., Pereira, L. V., Nascimento, L. M., ... Mussi, F. C. (n.d.). Ischemic stroke mortality and time for hospital arrival: analysis of the first 90 days. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, *57*, e20220309. <https://doi.org/10.1590/1980-220X->

REEUSP-2022-0309en

13. Montaña, A., Hanley, D. F., & Hemphill, J. C. (2021). Chapter 13 - Hemorrhagic stroke. In S. W. Hetts & D. L. Cooke (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 176, pp. 229–248). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64034-5.00019-5>
14. Foschi, M., Padroni, M., Abu-Rumeileh, S., Abdelhak, A., Russo, M., D'Anna, L., & Guarino, M. (2022). Diagnostic and Prognostic Blood Biomarkers in Transient Ischemic Attack and Minor Ischemic Stroke: An Up-To-Date Narrative Review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 31(3). <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106292>
15. Types of Stroke. (n.d.). *www.stroke.org*. Retrieved November 7, 2022, from <https://www.stroke.org/en/about-stroke/types-of-stroke>
16. Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E. (1993). 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*, 24(1), 35–41. <https://doi.org/10.1161/01.STR.24.1.35>
17. Cole, J. W. (2017). Large Artery Atherosclerotic Occlusive Disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 23(1), 133–157. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000436>
18. Knight-Greenfield, A., Nario, J. J. Q., & Gupta, A. (2019). Causes of Acute Stroke. *Radiologic clinics of North America*, 57(6), 1093–1108. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2019.07.007>
19. Marulanda-Londoño, E., & Chaturvedi, S. (2016). Stroke due to large vessel atherosclerosis. *Neurology: Clinical Practice*, 6(3), 252–258. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000247>
20. Arboix, A., & Alió, J. (2010). Cardioembolic Stroke: Clinical Features, Specific Cardiac Disorders and Prognosis. *Current Cardiology Reviews*, 6(3), 150–161. <https://doi.org/10.2174/157340310791658730>
21. Kamel, H., & Healey, J. S. (2017). Cardioembolic Stroke. *Circulation research*, 120(3), 514–526. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308407>
22. Caplan, L. R. (2015). Lacunar Infarction and Small Vessel Disease: Pathology and Pathophysiology. *Journal of Stroke*, 17(1), 2–6. <https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.1.2>
23. Gore, M., Bansal, K., & Asuncion, R. M. D. (2022). Lacunar Stroke. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563216/>
24. Arba, F., Mair, G., Phillips, S., Sandercock, P., Wardlaw, J. M., & null, null. (2020). Improving Clinical Detection of Acute Lacunar Stroke. *Stroke*, 51(5), 1411–1418. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.028402>
25. Arboix, A., Bechich, S., Oliveres, M., García-Eroles, L., Massons, J.,

- & Targa, C. (2001). Ischemic stroke of unusual cause: clinical features, etiology and outcome. *European Journal of Neurology*, 8(2), 133–139. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00180.x>
26. Panuganti, K. K., Tadi, P., & Lui, F. (2021). Transient Ischemic Attack. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459143/>
27. Kuriakose, D., & Xiao, Z. (2020). Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
28. Bogousslavsky, J., Van Melle, G., & Regli, F. (1988). The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*, 19(9), 1083–1092. <https://doi.org/10.1161/01.str.19.9.1083>
29. Mohr, J. P., Caplan, L. R., Melski, J. W., Goldstein, R. J., Duncan, G. W., Kistler, J. P., ... Bleich, H. L. (1978). The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology*, 28(8), 754–762. <https://doi.org/10.1212/wnl.28.8.754>
30. Hill, M. D., & Coutts, S. B. (2011). Preventing stroke after transient ischemic attack. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 183(10), 1127–1128. <https://doi.org/10.1503/cmaj.110704>
31. Coutts, S. B. (2017). Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 23(1), 82–92. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000424>
32. Lioutas, V.-A., Ivan, C. S., Himali, J. J., Aparicio, H. J., Leveille, T., Romero, J. R., ... Seshadri, S. (2021). Incidence of Transient Ischemic Attack and Association With Long-term Risk of Stroke. *JAMA*, 325(4), 373–381. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.25071>
33. Lavallée, P. C., Meseguer, E., Abboud, H., Cabrejo, L., Olivot, J.-M., Simon, O., ... Amarenco, P. (2007). A transient ischaemic attack clinic with round-the-clock access (SOS-TIA): feasibility and effects. *The Lancet Neurology*, 6(11), 953–960. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70248-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70248-X)
34. Rothwell, P. M., Giles, M. F., Chandratheva, A., Marquardt, L., Geraghty, O., Redgrave, J. N., ... Mehta, Z. (2007). Effect of urgent treatment of transient ischaemic attack and minor stroke on early recurrent stroke (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison. *The Lancet*, 370(9596), 1432–1442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61448-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61448-2)
35. Díaz-Guzmán, J., Egido, J.-A., Gabriel-Sánchez, R., Barberá-Comes, G., Fuentes-Gimeno, B., Fernández-Pérez, C., & Group, on behalf of the I. S. I. of the S. P. of the S. C. D. S. (2012). Stroke and Transient Ischemic Attack Incidence Rate in Spain: The IBERICTUS Study. *Cerebrovascular Diseases*, 34(4), 272–281. <https://doi.org/10.1159/000342652>
36. Nadarajan, V., Perry, R. J., Johnson, J., & Werring, D. J. (2014).

- Transient ischaemic attacks: mimics and chameleons. *Practical Neurology*, 14(1), 23–31. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2013-000782>
37. Khare, S. (2016). Risk factors of transient ischemic attack: An overview. *Journal of Mid-Life Health*, 7(1), 2–7. <https://doi.org/10.4103/0976-7800.179166>
38. Dopler, B. (2023). Stroke Prevention. *Delaware Journal of Public Health*, 9(3), 6–10. <https://doi.org/10.32481/djph.2023.08.003>
39. WHO. (2017, May 17). Cardiovascular diseases (CVDs). Retrieved May 2, 2021, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
40. Amort, M., Fluri, F., Weisskopf, F., Gensicke, H., Bonati, L. H., Lyrer, P. A., & Engelter, S. T. (2012). Etiological Classifications of Transient Ischemic Attacks: Subtype Classification by TOAST, CCS and ASCO – A Pilot Study. *Cerebrovascular Diseases*, 33(6), 508–516. <https://doi.org/10.1159/000337236>
41. Panuganti, K., Tadi, P., & Forshing, L. (2022, July 18). Transient Ischemic Attack - StatPearls - NCBI Bookshelf. *National library of Medicine*. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459143/>
42. A CLASSIFICATION and outline of cerebrovascular diseases. (1958). *Neurology*, 8(5), 395–434.
43. Ministerio de Sanidad - Profesionales - Estrategia en ictus. (n.d.). Retrieved June 3, 2024, from <https://www.sanidad.gob.es/areas/calidadAsistencial/estrategias/ictus/>
44. Dennis, M., Bamford, J., Sandercock, P., Molyneux, A., & Warlow, C. (1990). Computed tomography in patients with transient ischaemic attacks: when is a transient ischaemic attack not a transient ischaemic attack but a stroke? *Journal of Neurology*, 237(4), 257–261. <https://doi.org/10.1007/BF00314630>
45. Douglas, V. C., Johnston, C. M., Elkins, J., Sidney, S., Gress, D. R., & Johnston, S. C. (2003). Head Computed Tomography Findings Predict Short-Term Stroke Risk After Transient Ischemic Attack. *Stroke*, 34(12), 2894–2898. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000102900.74360.D9>
46. Albers, G. W., Caplan, L. R., Easton, J. D., Fayad, P. B., Mohr, J. P., Saver, J. L., & Sherman, D. G. (2002, November 21). Transient Ischemic Attack — Proposal for a New Definition. *New England Journal of Medicine*. Retrieved from <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMs020987>
47. Sorensen, A. G., & Ay, H. (2011). Transient Ischemic Attack Definition, Diagnosis, and Risk Stratification. *Neuroimaging clinics of North America*, 21(2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2011.01.013>
48. Uchiyama, S. (2010). [New definition and concept of TIA]. *Rinsho Shinkeigaku = Clinical Neurology*, 50(11), 904–906.

<https://doi.org/10.5692/clinicalneuro.50.904>

49. Panuganti, K. K., Tadi, P., & Lui, F. (2020). Transient Ischemic Attack. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459143/>

50. H. Buck, B., Akhtar, N., Alrohimi, A., Khan, K., & Shuaib, A. (n.d.). Stroke mimics: incidence, aetiology, clinical features and treatment. *Annals of Medicine*, 53(1), 420–436. <https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1890205>

51. Pohl, M., Hesszenberger, D., Kapus, K., Meszaros, J., Feher, A., Varadi, I., ... Feher, G. (2021). Ischemic stroke mimics: A comprehensive review. *Journal of Clinical Neuroscience*, 93, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2021.09.025>

52. Chtaou, N., Bouchal, S., Midaoui, A. E. L., Souirti, Z., Tachfouti, N., & Belahsen, M. F. (2020). Stroke Mimics: Experience of a Moroccan Stroke Unit. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association*, 29(5), 104651. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104651>

53. Okano, Y., Ishimatsu, K., Kato, Y., Yamaga, J., Kuwahara, K., Okumoto, K., & Wada, K. (2018). Clinical features of stroke mimics in the emergency department. *Acute Medicine & Surgery*, 5(3), 241–248. <https://doi.org/10.1002/ams2.338>

54. Whiteley, W. N., Wardlaw, J. M., Dennis, M. S., & Sandercock, P. A. G. (2011). Clinical scores for the identification of stroke and transient ischaemic attack in the emergency department: a cross-sectional study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 82(9), 1006–1010. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.235010>

55. Jadav, R. K., Mortazavi, R., & Yee, K. C. (2022). Blood Biomarkers for Triaging Patients for Suspected Stroke: Every Minute Counts. *Journal of Clinical Medicine*, 11(14), 4243. <https://doi.org/10.3390/jcm11144243>

56. Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

57. Dagonnier, M., Donnan, G. A., Davis, S. M., Dewey, H. M., & Howells, D. W. (2021). Acute Stroke Biomarkers: Are We There Yet? *Frontiers in Neurology*, 12. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.619721>

58. di Biase, L., Bonura, A., Pecoraro, P. M., Carbone, S. P., & Di Lazzaro, V. (2023). Unlocking the Potential of Stroke Blood Biomarkers: Early Diagnosis, Ischemic vs. Haemorrhagic Differentiation and Haemorrhagic Transformation Risk: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11545. <https://doi.org/10.3390/ijms241411545>

59. Ou, F.-S., Michiels, S., Shyr, Y., Adjei, A. A., & Oberg, A. L. (2021). Biomarker Discovery and Validation: Statistical Considerations. *Journal of*

- Thoracic Oncology*, 16(4), 537–545.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.01.1616>
60. Gao, J., Garulacan, L.-A., Storm, S. M., Opiteck, G. J., Dubaquie, Y., Hefta, S. A., ... Dongre, A. R. (2005). Biomarker discovery in biological fluids. *Methods*, 35(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.020>
61. Larkins, M. C., & Thombare, A. (2024). Point-of-Care Testing. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK592387/>
62. Lingervelder, D., Koffijberg, H., Kusters, R., & IJzerman, M. J. (2021). Health Economic Evidence of Point-of-Care Testing: A Systematic Review. *Pharmacoeconomics - Open*, 5(2), 157–173. <https://doi.org/10.1007/s41669-020-00248-1>
63. Tilea, I., Varga, A., & Serban, R. C. (2021). Past, Present, and Future of Blood Biomarkers for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction—Promises and Challenges. *Diagnostics*, 11(5), 881. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050881>
64. Kim, S. J., Mesquita, F. C. P., & Hochman-Mendez, C. (2023). New Biomarkers for Cardiovascular Disease. *The Texas Heart Institute Journal*, 50(5), e238178. <https://doi.org/10.14503/THIJ-23-8178>
65. Endres, M., Dirnagl, U., & Moskowitz, M. A. (2008). Chapter 2 The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 92, pp. 31–41). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(08\)01902-7](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(08)01902-7)
66. Reynolds, M. A., Kirchick, H. J., Dahlen, J. R., Anderberg, J. M., McPherson, P. H., Nakamura, K. K., ... Buechler, K. F. (2003). Early biomarkers of stroke. *Clinical Chemistry*, 49(10), 1733–1739. <https://doi.org/10.1373/49.10.1733>
67. Garg, P., Morris, P., Fazlanie, A. L., Vijayan, S., Dancso, B., Dastidar, A. G., ... Haaf, P. (2017). Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. *Internal and Emergency Medicine*, 12(2), 147–155. <https://doi.org/10.1007/s11739-017-1612-1>
68. Younger, J. F., Plein, S., Barth, J., Ridgway, J. P., Ball, S. G., & Greenwood, J. P. (2007). Troponin-I concentration 72 h after myocardial infarction correlates with infarct size and presence of microvascular obstruction. *Heart*, 93(12), 1547–1551. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.109249>
69. Wu, T., Chen, S.-R., Pan, H.-L., & Luo, Y. (2023). The  $\alpha\delta$ -1-NMDA receptor complex and its potential as a therapeutic target for ischemic stroke. *Frontiers in Neurology*, 14, 1148697. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1148697>
70. Wu, Q. J., & Tymianski, M. (2018). Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Molecular Brain*, 11(1), 15.

<https://doi.org/10.1186/s13041-018-0357-8>

71. Nouri-Vaskeh, M., Khalili, N., Sadighi, A., Yazdani, Y., & Zand, R. (2022). Biomarkers for Transient Ischemic Attack: A Brief Perspective of Current Reports and Future Horizons. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(4), 1046. <https://doi.org/10.3390/jcm11041046>
72. Zimmermann-Ivol, C. G., Burkhard, P. R., Floch-Rohr, J. L., Allard, L., Hochstrasser, D. F., & Sanchez, J.-C. (2004). Fatty Acid Binding Protein as a Serum Marker for the Early Diagnosis of Stroke: A Pilot Study \*. *Molecular & Cellular Proteomics*, *3*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300066-MCP200>
73. Kawano, T., Gon, Y., Sakaguchi, M., Yamagami, H., Abe, S., Hashimoto, H., ... SCAN Study Investigators. (2024). Von Willebrand Factor Antigen Levels Predict Poor Outcomes in Patients With Stroke and Cancer: Findings From the Multicenter, Prospective, Observational SCAN Study. *Journal of the American Heart Association*, *13*(3), e032284. <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.032284>
74. Li, J., Wang, Y., Lin, J., Wang, D., Wang, A., Zhao, X., ... Wang, Y. (2015). Soluble CD40L Is a Useful Marker to Predict Future Strokes in Patients With Minor Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke*, *46*(7), 1990–1992. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.008685>
75. Chojnowski, K., Opielka, M., Gozdalski, J., Radziwon, J., Dańczyszyn, A., Aitken, A. V., ... Winklewski, P. J. (2023). The Role of Arginine-Vasopressin in Stroke and the Potential Use of Arginine-Vasopressin Type 1 Receptor Antagonists in Stroke Therapy: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2119. <https://doi.org/10.3390/ijms24032119>
76. Purroy, F., Montaner, J., Rovira, Á., Delgado, P., Quintana, M., & Álvarez-Sabín, J. (2004). Higher Risk of Further Vascular Events Among Transient Ischemic Attack Patients With Diffusion-Weighted Imaging Acute Ischemic Lesions. *Stroke*, *35*(10), 2313–2319. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000141703.21173.91>
77. Bustamante Alejandro, López-Cancio Elena, Pich Sara, Penalba Anna, Giralt Dolors, García-Berrocoso Teresa, ... Montaner Joan. (2017). Blood Biomarkers for the Early Diagnosis of Stroke. *Stroke*, *48*(9), 2419–2425. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017076>
78. Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C., & Müller, M. (2013). PanelomiX: A threshold-based algorithm to create panels of biomarkers. *Translational Proteomics*, *1*(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.trprot.2013.04.003>
79. Dolmans, L. S., Rutten, F. H., Koenen, N. C. T., Bartelink, M.-L. E. L., Reitsma, J. B., Kappelle, L. J., & Hoes, A. W. (2019). Candidate Biomarkers for the Diagnosis of Transient Ischemic Attack: A Systematic Review.

*Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 47(5–6), 207–216. <https://doi.org/10.1159/000502449>

80. Erdoğan, M. Ş., Arpak, E. S., Keles, C. S. K., Villagra, F., Işık, E. Ö., Afşar, N., ... Saybaşılı, H. (2024). Biochemical, biomechanical and imaging biomarkers of ischemic stroke: Time for integrative thinking. *European Journal of Neuroscience*, 59(7), 1789–1818. <https://doi.org/10.1111/ejn.16245>

81. Lagerstedt, L., Egea-Guerrero, J. J., Bustamante, A., Montaner, J., Rodríguez-Rodríguez, A., El Rahal, A., ... Sanchez, J.-C. (2017). H-FABP: A new biomarker to differentiate between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175572>

82. Ye, X., He, Y., Wang, S., Wong, G. T., Irwin, M. G., & Xia, Z. (2018). Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) as a biomarker for acute myocardial injury and long-term post-ischemic prognosis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1155–1163. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.37>

83. Veerkamp, J. H., & Zimmerman, A. W. (2001). Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *Journal of Molecular Neuroscience*, 16(2), 133–142. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:133>

84. Guo, Q., Kawahata, I., Cheng, A., Jia, W., Wang, H., & Fukunaga, K. (2022). Fatty Acid-Binding Proteins: Their Roles in Ischemic Stroke and Potential as Drug Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9648. <https://doi.org/10.3390/ijms23179648>

85. Wunderlich, M. T., Hanhoff, T., Goertler, M., Spener, F., Glatz, J. F. C., Wallesch, C.-W., & Pelsers, M. M. A. L. (2005). Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *Journal of Neurology*, 252(6), 718–724. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0725-z>

86. Lagerstedt, L., Egea-Guerrero, J. J., Bustamante, A., Rodríguez-Rodríguez, A., El Rahal, A., Quintana-Díaz, M., ... Sanchez, J.-C. (2018). Combining H-FABP and GFAP increases the capacity to differentiate between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200394>

87. Sadighi, A., Abedi, V., Stanciu, A., El Andary, N., Banciu, M., Holland, N., & Zand, R. (2019). Six-Month Outcome of Transient Ischemic Attack and Its Mimics. *Frontiers in Neurology*, 10, 294. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00294>

88. Amarenco, P., Lavallée, P. C., Labreuche, J., Albers, G. W., Bornstein, N. M., Canhão, P., ... Wong, L. K. S. (2016). One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1533–1542. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412981>

89. Park, S.-Y., Kim, M.-H., Kim, O.-J., Ahn, H.-J., Song, J.-Y., Jeong, J.-

- Y., & Oh, S.-H. (2013). Plasma heart-type fatty acid binding protein level in acute ischemic stroke: Comparative analysis with plasma S100B level for diagnosis of stroke and prediction of long-term clinical outcome. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115(4), 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.06.004>
90. Park, S.-Y., Kim, J., Kim, O.-J., Kim, J.-K., Song, J., Shin, D.-A., & Oh, S.-H. (2013). Predictive value of circulating interleukin-6 and heart-type fatty acid binding protein for three months clinical outcome in acute cerebral infarction: multiple blood markers profiling study. *Critical Care*, 17(2), R45. <https://doi.org/10.1186/cc12564>
91. Wunderlich, M. T., Hanhoff, T., Goertler, M., Spener, F., Glatz, J. F. C., Wallesch, C.-W., & Pelsers, M. M. A. L. (2005). Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *Journal of Neurology*, 252(6), 718–724. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0725-z>
92. Dolmans, L. S., Rutten, F., Bartelink, M.-L. E. L., van Dijk, E. J., Nederkoorn, P. J., Kappelle, J., & Hoes, A. W. (2019). Serum biomarkers in patients suspected of transient ischaemic attack in primary care: a diagnostic accuracy study. *BMJ Open*, 9(10). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031774>
93. Howick, J., Cals, J. W. L., Jones, C., Price, C. P., Plüddemann, A., Heneghan, C., ... Thompson, M. (2014). Current and future use of point-of-care tests in primary care: an international survey in Australia, Belgium, The Netherlands, the UK and the USA. *BMJ Open*, 4(8). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005611>
94. Guttmann, A., Schull, M. J., Vermeulen, M. J., & Stukel, T. A. (2011). Association between waiting times and short term mortality and hospital admission after departure from emergency department: population based cohort study from Ontario, Canada. *The BMJ*, 342, d2983. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2983>
95. Nørgaard, B., & Mogensen, C. B. (2012). Blood sample tube transporting system versus point of care technology in an emergency department; effect on time from collection to reporting? A randomised trial. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 20, 71. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-20-71>
96. Rooney, K. D., & Schilling, U. M. (2014). Point-of-care testing in the overcrowded emergency department – can it make a difference? *Critical Care*, 18(6), 692. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0692-9>
97. Lahr, M. M. H., van der Zee, D.-J., Luijckx, G.-J., Vroomen, P. C. A. J., & Buskens, E. (2013). A Simulation-based Approach for Improving Utilization of Thrombolysis in Acute Brain Infarction. *Medical Care*, 51(12), 1101–1105. <https://doi.org/10.1097/MLR.0b013e3182a3e505>

98. Weber, J. E., Ebinger, M., Rozanski, M., Waldschmidt, C., Wendt, M., Winter, B., ... STEMO-Consortium, F. T. (2013). Prehospital thrombolysis in acute stroke: Results of the PHANTOM-S pilot study. *Neurology*, *80*(2), 163–168. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827b90e5>
99. APOC3 apolipoprotein C3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. (n.d.). Retrieved October 28, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/345>
100. Meyers, N. L., Larsson, M., Vorrsjö, E., Olivecrona, G., & Small, D. M. (2017). Aromatic residues in the C terminus of apolipoprotein C-III mediate lipid binding and LPL inhibition. *Journal of Lipid Research*, *58*(5), 840–852. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071126>
101. Pechlaner, R., Tsimikas, S., Yin, X., Willeit, P., Baig, F., Santer, P., ... Mayr, M. (2017). Very-Low-Density Lipoprotein–Associated Apolipoproteins Predict Cardiovascular Events and Are Lowered by Inhibition of APOC-III. *Journal of the American College of Cardiology*, *69*(7), 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.065>
102. Olivieri, O., Cappellari, M., Turcato, G., Bonetti, B., Girelli, D., Pizzolo, F., ... Martinelli, N. (2020). Increased Incidence of Ischemic Cerebrovascular Events in Cardiovascular Patients With Elevated Apolipoprotein CIII. *Stroke*, *51*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.026811>
103. Borén, J., Packard, C. J., & Taskinen, M.-R. (2020). The Roles of ApoC-III on the Metabolism of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Humans. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 474. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00474>
104. Rocha, N. A., East, C., Zhang, J., & McCullough, P. A. (2017). ApoCIII as a Cardiovascular Risk Factor and Modulation by the Novel Lipid-Lowering Agent Volanesorsen. *Current Atherosclerosis Reports*, *19*(12), 62. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0697-3>
105. Dib, I., Khalil, A., Chouaib, R., El-Makhour, Y., & Noureddine, H. (2021). Apolipoprotein C-III and cardiovascular diseases: when genetics meet molecular pathologies. *Molecular Biology Reports*, *48*(1), 875–886. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06071-5>
106. Chin, B. S. P., Conway, D. S. G., Chung, N. A. Y., Blann, A. D., Gibbs, C. R., & Lip, G. Y. H. (2003). Interleukin-6, tissue factor and von Willebrand factor in acute decompensated heart failure: relationship to treatment and prognosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, *14*(6), 515–521. <https://doi.org/10.1097/00001721-200309000-00001>
107. Papadopoulos, A., Palaiopanos, K., Björkbacka, H., Peters, A., de Lemos, J. A., Seshadri, S., ... Georgakis, M. K. (2022). Circulating Interleukin-6 Levels and Incident Ischemic Stroke. *Neurology*, *98*(10), e1002–

- e1012. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000013274>
108. Shaafi, S., Sharifipour, E., Rahmanifar, R., Hejazi, S., Andalib, S., Nikanfar, M., ... Mehdizadeh, R. (2014). Interleukin-6, a reliable prognostic factor for ischemic stroke. *Iranian Journal of Neurology*, *13*(2), 70. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187333/>
109. Aref, H. M. A., Fahmy, N. A., Khalil, S. H., Ahmed, M. F., ElSadek, A., & Abdulghani, M. O. (2020). Role of interleukin-6 in ischemic stroke outcome. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, *56*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41983-019-0121-8>
110. Tuttolomondo, A., Pinto, A., Corrao, S., Di Raimondo, D., Fernandez, P., Di Sciacca, R., ... Licata, G. (2009). Immuno-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic variables associated with acute ischemic stroke diagnosis. *Atherosclerosis*, *203*(2), 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.030>
111. Gagnano, F., Sperlongano, S., Golia, E., Natale, F., Bianchi, R., Crisci, M., ... Calabrò, P. (2017). The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 5620314. <https://doi.org/10.1155/2017/5620314>
112. Denorme, F., Vanhoorelbeke, K., & De Meyer, S. F. (2019). von Willebrand Factor and Platelet Glycoprotein Ib: A Thromboinflammatory Axis in Stroke. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02884>
113. Buchtele, N., Schwameis, M., Gilbert, J. C., Schörghofer, C., & Jilma, B. (2018). Targeting von Willebrand Factor in Ischaemic Stroke: Focus on Clinical Evidence. *Thrombosis and Haemostasis*, *118*(6), 959–978. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1648251>
114. McCabe, D. J. H., Murphy, S. J. X., Starke, R., Harrison, P., Brown, M. M., Sidhu, P. S., ... Machin, S. J. (2015). Relationship between ADAMTS13 activity, von Willebrand factor antigen levels and platelet function in the early and late phases after TIA or ischaemic stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, *348*(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.10.035>
115. Walia, A., Yang, J. F., Huang, Y., Rosenblatt, M. I., Chang, J.-H., & Azar, D. T. (2015). Endostatin's Emerging Roles in Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Disease, and Clinical Applications. *Biochimica et biophysica acta*, *1850*(12), 2422–2438. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.007>
116. Johnson, E. D., Schell, J. C., & Rodgers, G. M. (2019). The D-dimer assay. *American Journal of Hematology*, *94*(7), 833–839. <https://doi.org/10.1002/ajh.25482>
117. Ahmad, A., Islam, Z., Manzoor Ahmad, S., Sarfraz, Z., Sarfraz, A., Felix, M., & Cherrez-Ojeda, I. (2022). The correlation of D-dimer to stroke

diagnosis within 24 hours: A meta-analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(3), e24271. <https://doi.org/10.1002/jcla.24271>

118. Rodríguez-Castro, E., Hervella, P., López-Dequidt, I., Arias-Rivas, S., Santamaría-Cadavid, M., López-Loureiro, I., ... Iglesias-Rey, R. (2020). NT-pro-BNP: A novel predictor of stroke risk after transient ischemic attack. *International Journal of Cardiology*, 298, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.06.056>

## **ANEXOS**

ANEXO 1

*Neutrophil-lymphocyte ratio in the differentiation of Transient Ischemic Attack and Stroke Mimics*

Despite the advance in neuroimaging studies and diagnostic criteria, the accurate diagnosis of transient ischemic attack (TIA) is still unclear. For this reason, there are different new approaches in order to improve the accuracy of this diagnosis. One example is to use the complete blood count information, in particular the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR). Since, several studies report the usefulness of this ratio (1) (2) (3).

To evaluate this approach, we conducted a retrospective study in which we took into account all the complete blood count (CBC) parameters, focusing on NLR, in order to differentiate TIA and stroke mimics. However, unlike previous studies, here we have considered a variety of disorders

that simulated a TIA, considered in the clinic as mimics, in order to mirror the population, we would find in an emergency department, and provide greater value to the diagnostic differentiation.

For this purpose, 121 patients (47 AIT vs 74 mimics) from a previous cohort were included in the present study. These patients were admitted into the emergency department of Vall d'Hebrón or Germans Trias i Pujol Hospitals. CBC parameters evaluated within 24 hours of symptom onset were taken into account (4).

Comparisons between groups (TIA vs Mimic) were performed using the Mann-Whitney test or the t-test, depending on the distribution of the variable. Data were expressed as number (%) for categorical

variables, and as median and interquartile range for continuous variables, depending on the distribution of the variables. A graphical representation of the NLR distribution in each mimic group was shown. However, no statistical test was applied due to limited number of the patients in each pathology. A logistic regression analysis was performed for two models: the first model, considered as the clinical model, was formed by age and sex, and the final model was formed by the clinical model, and the NLR. Only NLR was included because it was the most repeated parameter in previous studies. These two models

were compared with the likelihood ratio test (LRT), in order to compare goodness-of-fit (how well the data fit the final prediction). Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to determine the area under the curve (AUC) for both models. Finally, the AUC of both models were compared with the De Long test.

The results of the group comparison suggest statistically significant differences in age, neutrophil count, white blood cells count (WBC) and platelets. The other parameters did not reach statistical significance [Table 1].

**Table 1** Baseline characteristics of sample and complete blood count parameter

	<b>TIA (N=47)</b>	<b>Mimic (N=74)</b>	<b>p value</b>
<b>Age</b>	77.00 [65.50-80.50]	59.00 [47.25-73.75]	<0.001 *
<b>Sex (Female)</b>	40 (54.1)	23 (48.9)	0.583
<b>Neutrophil x10<sup>9</sup>/L</b>	5.10 [3.80-6.27]	6.40 [4.52-8.17]	0.001*
<b>Lymphocytes x10<sup>9</sup>/L</b>	1.85 [1.22-2.37]	1.75 [1.20-.47]	0.998
<b>WBC* x10<sup>9</sup>/L</b>	9.20 [7.10-11.20]	7.90 [6.55-9.07]	0.008*
<b>NRL*</b>	2.86 [2.03-4.32]	3.00 [1.86-5.83]	0.25
<b>MCV* fL</b>	90.70 [88.47-93.40]	90.35 [88.05-94.17]	0.97
<b>MCH* pg</b>	30.40 [29.20-31.95]	30.65 [29.75-31.90]	0.66
<b>MCHC* g/dL</b>	33.49 (0.94)	33.65 (0.85)	0.34
<b>RDW* %</b>	14.25 [13.30-14.87]	13.80 [13.40-14.70]	0.38
<b>Platelets x10<sup>9</sup>/L</b>	213.73 (71.05)	241.96 (75.86)	0.04 <sup>+</sup>
<b>MPV* fL</b>	9.15 (1.05)	9.01 (1.03)	0.48

\*NRL indicates neutrophile ratio lymphocyte. \*MCV mean red volume. \*MCH mean corpuscular Haemoglobin. \*MCHV mean corpuscular Haemoglobin Concentration. \*RDW Red blood cell Distribution Width. \* MPV mean platelet volume. \*P value <0.01. <sup>+</sup>P <0.05

Binary logistic regression results pointed to an association between NLR and age with final diagnosis (TIA or mimic). On the other hand, the result of the likelihood ratio test suggested that the final model is better than the clinical model alone ( $p = 0.002$ ). However, the results of the AUC comparison of both

models, using the De Long test, did not reach statistical significance (Table 2) suggesting that there is no significant improvement in the AUC of the final model (0.74 [0.65-0.83]), when compared to the AUC of the clinical model (0.78 [0.70-0.86]).

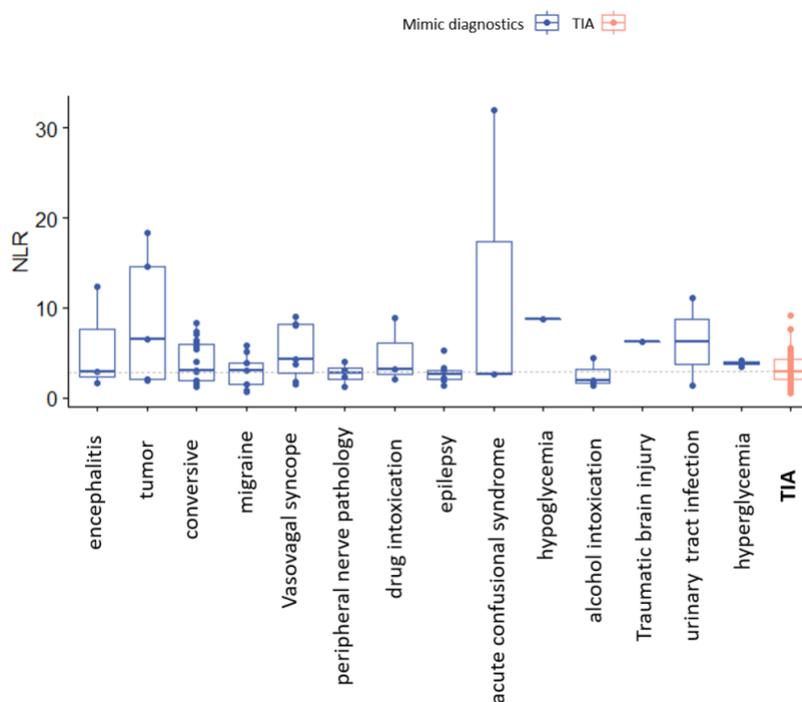
**Table 2** Results of the binary logistic regression analysis and the evaluation of both models

	<b>Clinical Model</b>			<b>Clinical + NRL (Final Model)</b>		
<b>Logistic regression</b>	<b>OR</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>p value</b>	<b>OR</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>p value</b>
Age	0.94	(0.91;0.97)	< 0.001*	0.93	(0.90;0.96)	< 0.001*
Sex	1.85	(0.82;4.34)	0.142	1.89	(0.80;4.62)	0.151
NLR*	-	-	-	1.27	(1.08;1.58)	0.014 <sup>+</sup>
						<b>p value</b>
<b>LRT*</b>						0.002*
	<b>AUC</b>	<b>[95% CI]</b>		<b>AUC</b>	<b>[95% CI]</b>	
<b>AUC*</b>	0.74	(0.65;0.83)		0.78	(0.70;0.86)	
		<b>[95% CI]</b>		<b>[95% CI]</b>	<b>p value</b>	
<b>De Long test</b>		(0.64;0.83)		(0.69;0.86)	0.127	

NLR means neutrophil-to-lymphocyte ratios. LTR likelihood ratio test. AUC area under the curve. \*P value <0.01. <sup>+</sup>P <0.05

The distribution graph of NLR levels indicated that the pathologies with low levels compared to the median of TIA were: epilepsy, acute confusional syndrome, and alcohol intoxication. On the other

hand, the median of peripheral nerve pathology is positioned at a level equivalent to the median of the TIA. The remaining pathologies are above TIA median [Figure 1].



**Figure 1** Distribution graph. This graph shows the distribution of NLR levels in the different pathologies within the mimics group (blue color) and in the TIA group. The gray line crosses all the pathologies of the mimic group is the reference point of the median of the NLR level of the TIA group (in this way it is possible to better identify pathologies that present higher or lower levels than a TIA).

The complete blood count or hemogram is a routine and easy test to perform. Due to the ease and low cost, these tests are emerging as one of the most accepted for diagnostic differentiation, not only in stroke but also in TIA (5) (6). In this study, we saw that neutrophils, platelets, and WBC reached statistical significance when comparing TIA

and mimics, while the distribution of the NLR did not show significant differences. However, in the logistic regression NLR obtains a statistically significant value. This is due to the fact that the NLR levels alone cannot differentiate between TIA and mimic (group comparison) but if confounding variables such as age and sex are

taking into account, NLR could differentiate the diagnosis (logistic regression).

Specifically, the results of the logistic regression analysis showed that the NLR obtained a p-value of less than 0.05, as did the age variable. This suggests an association between NLR, age and TIA diagnosis. Likewise, the result of the LRT indicates that the final model describes the data better than the clinical model alone, which in some way could support the result obtained in the previous studies (1)(2)(7). Despite what has been mentioned so far, the De Long test, indicates that the predictions of the final model do not represent an improvement compared to the clinical model, which leads us to think that the final model is not good enough, when making a differential diagnosis between TIA and mimic.

It should be emphasized that our results, are in the opposite way to those obtained in previous studies, a plausible explanation for this is the variety of mimics that we considered here. This diversity is a strong point of our research, because this simulated a real situation in the emergency department, making the study more translational. Moreover, to our knowledge, this is the first study that has considered different pathologies to evaluate the potential of NLR, in the diagnostic of the TIA.

In this sense, the pathologies within the mimics that obtained higher levels of NLR compared to TIA were: tumor, vasovagal syncope, hypoglycemia, traumatic brain injury, urinary infection and hyperglycemia. Most of these pathologies are related to an elevated WBC, especially in inflammatory and infectious processes (8)(9).

In conclusion, in the sample with which we worked, mimics patients presented disorders related to inflammatory or infection processes. Therefore, higher NLR levels were more frequent in this type of patients than in TIA patients. On another hand, NLR seem to be associated with the prediction of the final diagnosis (TIA vs mimic), when adjusted for age and sex.

Finally, it is necessary to clarify that our study presents important limitations. First, we worked with a limited sample size. Second, patients in some mimic pathologies were underrepresented. Hence, working with limited data from patients in a retrospective cohort could add some selection bias. Therefore, we suggest that our results should be validated in a different cohort that covers our limitations.

## References

1. Chan KL, Feng X, Ip B, Huang S, Ma SH, Fan FSY, et al. Elevated Neutrophil to Lymphocyte Ratio Associated With Increased Risk of Recurrent Vascular Events in Older Minor Stroke or TIA Patients. *Front Aging Neurosci.* 2021 Apr 20;13:646961.
2. Salman N, Bayramoglu A, Ihsanyüce, Lütfiözel, Tezel O, Acar YA. Transient Ischemic Attack Versus Seizure: Use of Complete Blood Count Parameters for Differential Diagnosis. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2016 Aug;10(8):OC45–8.
3. Parizadeh SM, Jafarzadeh-Esfehani R, Bahreyni A, Ghandehari M, Shafiee M, Rahmani F, et al. The diagnostic and prognostic value of red cell distribution width in cardiovascular disease; current status and prospective. *BioFactors.* 2019;45(4):507–16.
4. Montaner J, Ribó M, Monasterio J, Molina CA, Alvarez-

Sabín J. Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor Levels in the Acute Phase of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2003 Apr 1;34(4):1038–40.

5. Gökhan S, Özhasenekler A, Durgun HM, Akil E, Üstündag M, Orak M. Neutrophil lymphocyte ratios in stroke subtypes and transient ischemic attack. :5.

6. Sharma D, Spring KJ, Bhaskar SMM. Neutrophil–lymphocyte ratio in acute ischemic stroke: Immunopathology, management, and prognosis. *Acta Neurol Scand*. 2021;144(5):486–99.

7. Xue J, Huang W, Chen X, Li Q, Cai Z, Yu T, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Is a

Prognostic Marker in Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017 Mar 1;26(3):650–7.

8. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2016 Jun 1;457:46–53.

9. Leick M, Azcutia V, Newton G, Luscinskas FW. Leukocyte Recruitment in Inflammation: Basic Concepts and New Mechanistic Insights Based on New Models and Microscopic Imaging Technologies. *Cell Tissue Res*. 2014 Mar;355(3):647–56.

## *CARRERA CIENTÍFICA DE LA DOCTORANDA*

### Formación académica universitaria

- **Doctorado en Neurociencias (2020-2024).** Universitat Autònoma de Barcelona, España. Laboratorio de investigación Neurovascular (LIN). Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona.
- **Máster Oficial en Investigación en Comportamiento y Cognición (2020-2021).** Universidad de Barcelona, España.
- **Grado en Psicología (2014-2019).** Universidad de La Habana, Cuba.

### Producción científica

- **Daisy Guamán-Pilco** Elvira Chocano Elena Palà Marcel Lamana-Vallverdú Anna Penalba Paula García-Rodríguez Marta Rubiera Alejandro Bustamante Àlex Rovira Soledad Pérez-Sánchez Leire Azurmendi Sandrine Reymond Jean-Charles Sánchez Joan Montaner. H-FABP as a Biomarker in Transient Ischemic Attack. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2024 Aug 19.
- 
- Elena Palà, Paula García-Rodríguez, Alejandro Bustamante, Anna Penalba, Marcel Lamana-Vallverdú, **Daisy R Guamán-Pilco**, Pilar Delgado, Iolanda Riba, Joan Jimenez-Balado, Alejandra Planas, Olga Simó-Servat, Irene Escudero-Martinez, Joan Montaner. Common and specific proteins and pathways in heart and cerebral ischemia. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2024 Jan;33(1):107467.
-

- Pilco-Janeta D, De la Cruz Myriam, **Guamán-Pilco Daisy**, Fernández Otman. Brief non-verbal memory test for use in the field neurological practice. MEDICIENCIAS-UTA.2017;1(4):1-9.

#### Participación en proyectos de investigación

*AFRICAT*: Atrial Fibrillation Research In Catalonia: Sequential clinic electrophysiological screening among high risk individuals (201528-30-31-3). La Marató de TV3: Joan Montaner.

*ODEA-TIA*: Optimal Detection of Atrial fibrillation in Transient Ischemic Attack.

*PRESTIGE-AF*: PREvention of Stroke in Intracerebral hemorrhage survivors with Atrial Fibrillation. Grant Agreement num 754517. Unió Europea Horizon 2020.

#### Formación científica cursos y congresos

- Asistencia y presentación de una comunicación en formato póster en el 76th Annual Meeting 2024. American Academy of Neurology. 13-18 de Abril 2024. Denver, Estados Unidos. Título de la presentación: H-FABP as a biomarker of vascular brain damage in Transient Ischemic Attack
- Asistencia y presentación de una comunicación en formato póster en la 9th European Stroke Organization Conference (ESOC). 24-26 de Mayo 2023. Munich, Germany. Título de la presentación: H-FABP as a biomarker of vascular brain damage in transient ischemic attack.
- Asistencia y presentación de una comunicación en formato póster en la jornada científica y 27 Conferència Anual del Vall d'Hebron,

organizado por la Fundació Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). 23 de Noviembre 2023. Título de la presentación: H-FABP as a biomarker of vascular brain damage in transient ischemic attack.

- Asistencia y presentación de una comunicación en formato póster en la jornada científica IX INC- UAB Scientific Conferences, Hotel Eden Roc, in Sant Feliu de Guíxols. 5-7 Octubre 2022. Título de la presentación: H-FABP as a biomarker of vascular brain damage in transient ischemic attack.
- Asistencia al Congreso Internacional de Neuropsicología Aplicada, organizado por la Asociación Española de Psicología Sanitaria AEPSIS. 25 y 26 de Marzo 2021, online.