

---

Trabajo Fin de Grado  
Grado en Fisioterapia

---

**Efecto de la estimulación eléctrica funcional sobre la  
función motora y la actividad de la cadena de  
transporte de electrones en muestras de sangre  
periférica de pacientes con accidentes  
cerebrovasculares**

Estudio cuasiexperimental sin fármacos

Autor:

Ane Larrea Rodríguez

Directora:

María Torrecilla Sesma

Co-director:

Gabriel Barreda Gómez

Leioa, 2 de mayo de 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a mis directores María Torrecilla y Gabriel Barreda la confianza depositada en mi desde el primer momento y la labor de dirección realizada.

A Aitor Martín y todo el equipo de Fesia Technology, por su disposición y ayuda. También, a mis compañeras de laboratorio por sus consejos.

Y por último y, sobre todo, a los pacientes que han querido formar parte en este proyecto.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 VÍA PIRAMIDAL: ACCIDENTES CEREBROVASCULARES .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Vía y síndromes piramidales .....	1
1.1.2 Accidente cerebrovascular .....	1
<b>1.2 MITOCONDRIA: DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LOS ACCIDENTES CEREBROVASCULARES .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Fisiología de la cadena transportadora de electrones .....	3
1.2.2 Disfunción mitocondrial en los accidentes cerebrovasculares .....	4
<b>1.3 ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA FUNCIONAL: EVIDENCIAS Y EFECTOS PRODUCIDOS EN LA MITOCONDRIA.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Estimulación eléctrica funcional .....	5
1.3.2 Impacto de la estimulación eléctrica funcional en la mitocondria .....	7
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SUJETOS.....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Criterios de inclusión.....	9
3.2.2 Criterios de exclusión.....	9
3.2.3 Criterios de eliminación .....	9
<b>3.3 TAMAÑO MUESTRAL .....</b>	<b>9</b>

<b>3.4 SUJETOS A ESTUDIO .....</b>	<b>10</b>
<b>3.5 INTERVENCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>3.6 ESCALAS DE VALORACIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>3.7 REACTIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.8 EXTRACCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.9 AISLAMIENTO DE PLAQUETAS Y CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.10 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.11 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR NADH DESHIDROGENASA EN SANGRE PERIFÉRICA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.12 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR SUCCINATO DESHIDROGENASA EN SANGRE PERIFÉRICA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.13 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR GLICEROALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA EN SANGRE PERIFÉRICA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA EN SANGRE PERIFÉRICA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.15 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR MAO EN SANGRE PERIFÉRICA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.16 TRATAMIENTO DE DATOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3.17 VARIABLES .....</b>	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 VALORACIÓN FUNCIONAL Y MOTORA DE LA MUSCULATURA.....</b>	<b>18</b>
4.1.1 Berg .....	19

4.1.2 Rango de movimiento articular .....	19
4.1.3 Asworth .....	20
4.1.4 Daniels.....	21
4.1.5 Sit to Stand .....	21
4.1.6 Fugl-Meyer.....	22
<b>4.2 ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES .....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Determinación de la formación de superóxido inducida por NADH deshidrogenasa en sangre periférica .....	23
4.2.2 Determinación de la formación de superóxido inducida por succinato deshidrogenasa en sangre periférica.....	24
4.2.3 Determinación de la formación de superóxido inducida por el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en sangre periférica.....	27
4.2.4 Determinación de la actividad citocromo c oxidasa en sangre periférica .....	29
4.2.5 Determinación de la formación de superóxido inducida por MAO en sangre periférica.....	30
<b>4.3 ANÁLISIS CORRELACIONES ENTRE ACTIVIDADES MITOCONDRIALES Y VALORACIÓN FUNCIONAL Y MOTORA.....</b>	<b>33</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACV: Accidente cerebrovascular.

ATP: Adenosín trifosfato.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CCo: Citocromo C oxidasa.

CTEM: Cadena transportadora de electrones mitocondrial.

DAB: 3,3'-diaminobencidina.

D.O: Densidad óptica.

dUQ: Decil-ubiquinona.

EIM: Espacio intermembrana mitocondrial.

EM: Esclerosis múltiple.

FES: Estimulación eléctrica funcional.

G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

HTA: Hipertensión arterial.

LME: Lesiones medulares espinales.

MAO: Monoaminoxirreductasa.

MME: Membrana externa mitocondrial.

MMI: Membrana interna mitocondrial.

NADHDH: Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa.

NBT: Nitro azul de tetrazolio.

PC: Parálisis cerebral.

PLQ: Plaquetas.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

R.O.M: Rango de movimiento articular.

SDH: Succinato sódico dibásico.

SSB: Solución salina balanceada.

## RESUMEN

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) cursan con trastornos motores secundarios a la lesión inicial. A nivel mitocondrial se produce un incremento del estrés oxidativo, ocasionando daño tisular y relacionándose con las alteraciones de la función motora. La terapia con estimulación eléctrica funcional (FES) puede restaurar la actividad mitocondrial en pacientes con ACVs y traducirse, a su vez, en una mejoría de la función motora muscular.

Para estudiar el impacto de la terapia FES sobre la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEM) y sobre la función motora, se llevaron a cabo análisis *in vitro*, mediante espectrofotometría ultravioleta-visible de la actividad de los complejos (I, II y IV), del gliceroaldehído-3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y de la monoaminoxidasa (MAO), en células mononucleares periféricas de pacientes con ACVs. La actividad del complejo II y de la MAO, se determinó también en plaquetas. La función motora fue evaluada a través de diferentes escalas de fisioterapia. Ambas variables fueron medidas antes y después de 12 sesiones de tratamiento con FES (2 por semana).

Los resultados mostraron que la actividad de los complejos de la CTEM, el G3PDH y la MAO se encontraba significativamente reducida en los pacientes con ACVs pretratamiento, tanto en células mononucleares periféricas como en plaquetas; exceptuando el complejo II en plaquetas y la MAO en células mononucleares periféricas. Sin embargo, tras el tratamiento con FES, la actividad mitocondrial de todos los complejos, del G3PDH y de la MAO se encontró significativamente incrementada, en los pacientes con ACVs, en ambos tipos celulares. Además, se detectaron correlaciones significativas entre la recuperación de la actividad enzimática y la función motora en pacientes con ACVs.

En conclusión, los estudios preliminares indican que la FES puede restablecer la función motora y la actividad mitocondrial, que se encuentran dañadas en pacientes con ACVs. También, la correlación entre ambas variables podría señalar la relación existente entre las disfunciones de la CTEM y las del músculo esquelético. No obstante, se deben llevar a cabo más estudios para determinar si los cambios en la actividad mitocondrial y función motora pueden ser usados como biomarcadores de la patología y/o de la eficacia del tratamiento con FES.

**Palabras clave:** mitocondria, estimulación eléctrica funcional, accidente cerebrovascular

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 VÍA PIRAMIDAL: ACCIDENTES CEREBROVASCULARES**

### **1.1.1 Vía y síndromes piramidales**

El sistema piramidal es un cúmulo de axones motores que presenta dos tractos, el corticonuclear (1) que se origina en la corteza cerebral para finalizar a nivel del tronco encefálico y el corticoespinal (2), cuyo trayecto va desde la corteza cerebral hasta la médula espinal para realizar sinapsis con la segunda motoneurona (1,3). A continuación, los impulsos nerviosos se transmiten hacia diferentes músculos esqueléticos. En consecuencia, el sistema piramidal, es responsable de movimientos voluntarios rápidos y finos (4). Cabe destacar que, en la parte anterior del bulbo, la mayoría de los axones motores se decusan al lado contralateral y por ello, el hemisferio cerebral controla el hemicuerpo del lado contrario (5).

Los síndromes piramidales son consecuencia de lesiones producidas en las neuronas implicadas en el control muscular (vía piramidal) (1). La sintomatología se manifiesta, de manera general con trastornos motores y en función de la motoneurona afectada pueden presentarse los siguientes signos (6):

- Motoneurona superior: espasticidad, hiperreflexia, debilidad.
- Motoneurona inferior: atrofia, arreflexia, hipotonía.

Dentro de los síndromes piramidales se clasifica la esclerosis múltiple (EM), las lesiones medulares espinales (LME), los accidentes cerebro vasculares (ACV) y la parálisis cerebral (PC), entre otras (7,8).

### **1.1.2 Accidente cerebrovascular**

Los ACVs son aquellos trastornos que producen alteraciones funcionales y estructurales neuronales en distintas áreas cerebrales, debido a una hipoxia mantenida, consecuencia de una variación brusca (interrupción o reducción) en la circulación cerebral en dicha(s) región(es) (9). Así, el ACV ocasiona un déficit transitorio o definitivo del funcionamiento de las mismas, provocando así alteraciones sensitivas, motoras y cognitivas (10).

El ACV supone la primera causa de discapacidad en Europa, y a la segunda causa de muerte, estimándose su incidencia entre 95-190/100.000 habitantes al año (11). Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) y la Sociedad Española de Neurología (SEN), a principios de

2022, los casos en España ascendían, aproximadamente, a un total de 330.000. El 50 % de las personas que sufren un ACV presenta algún tipo de discapacidad para las actividades básicas de la vida diaria (ABVD) (12).

Los ACVs puede clasificarse en dos subtipos en base a la causa que determina la presencia de la patología: isquémico (80%) y hemorrágico (20%) (13).

- El ACV isquémico se produce consecuencia de una disminución e insuficiencia de aporte de sangre al SNC, provocando un área circunscrita de infarto cerebral. Atendiendo a su etiología pueden subclasificarse en: trombótico, por la formación de un coágulo de sangre en una arteria cerebral *in situ*; y embólico, por la formación de un coágulo de sangre en otro lugar del cuerpo que, posteriormente, se desplaza al cerebro (embolias arterio-arteriales y embolias cardio-cerebrales). Cuando los síntomas se mantienen menos de 24 horas, es denominado un accidente isquémico transitorio (AIT) (14).
- El ACV hemorrágico es debido a sangrados parenquimatosos y/o subaracnoideos. Generalmente, son causados por hipertensión arterial (HTA), roturas de aneurismas y/o malformaciones arteriovenosas (13).

En función de la zona afectada, las funciones alteradas variarán, aunque es muy frecuente que el ACV dé lugar a la afectación del sistema piramidal, ocasionando así un síndrome de primera motoneurona o motoneurona superior. Es importante destacar que, en caso de producirse en los ganglios basales o cerebelo, este daño se clasificará dentro de los síndromes extrapiramidales (15).

Las manifestaciones clínicas del ACV pueden clasificarse dependiendo de si hacen referencia a una pérdida o disminución de las funciones (manifestaciones clínicas negativas) o a la aparición de funciones nuevas o anormales (manifestaciones clínicas positivas) (16).

Por un lado, las manifestaciones clínicas negativas engloban: abolición de los reflejos superficiales, así como parálisis o paresia de músculos, cuyos centros están presentes en niveles infralesionales (16).

Por otro lado, las manifestaciones clínicas positivas abarcan: espasticidad muscular (generalmente en musculatura antigravitatoria) e hiperreflexia de la musculatura cuyos centros se encuentran en la zona infralesional; apareciendo reflejos patológicos y clonus (16).

## 1.2 MITOCONDRIA: DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LOS ACCIDENTES CEREBROVASCULARES

### 1.2.1 Fisiología de la cadena transportadora de electrones

La mitocondria es un orgánulo presente en la mayor parte de las células eucariotas, aunque el número aumenta en los tejidos que requieren mayor energía como es el caso del sistema nervioso o tejido muscular (17). Se compone de una membrana externa (MME) e interna (MMI), encontrándose entre ellas el espacio intermembrana (EIM). La MMI contiene diferentes complejos que forman la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEM), involucrados en la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) mediante fosforilación oxidativa (18).

En el complejo I, también denominado nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (NADHDH) o NADH ubiquinona oxidorreductasa, se produce la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$ ; a través de la transferencia de  $2e^-$  a la molécula de ubiquinona (coenzima Q) para reducirla a ubiquinol. Esto da lugar a la translocación de 4 protones al EIM (19). Los electrones son transportados al complejo III, complejo citocromo bc1 o Ubiquinona-citocromo C oxidorreductasa, mediante la ubiquinona. El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo C. Este complejo también produce la translocación de 4 protones al EIM. Seguidamente, los 2 electrones se dirigen al complejo IV, complejo C oxidasa, a través del citocromo C; donde se cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo C reducido al oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ), dando lugar a moléculas de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (20). Los protones transportados por este complejo, en este caso, son 2. El complejo V, ATP sintasa, da lugar a la síntesis de ATP gracias a la energía del gradiente electroquímico transmembrana; provocado por el paso de protones de los complejos I, III y IV (21).

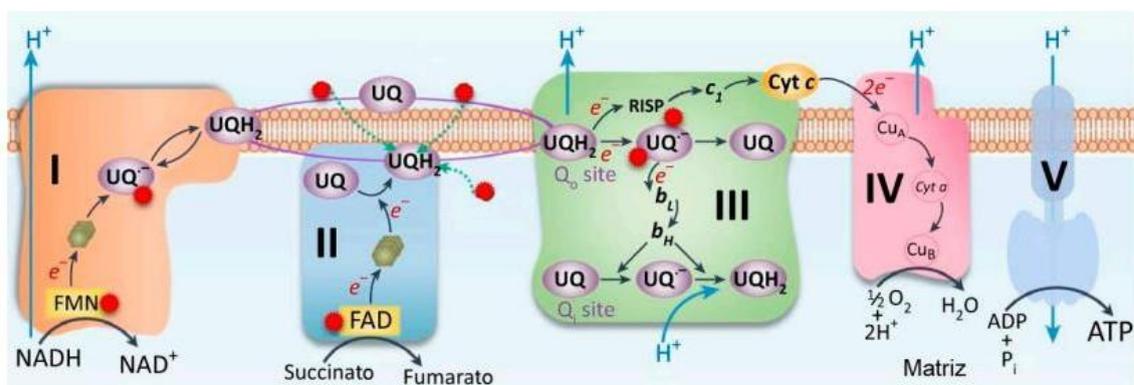


Figura 1. Esquema del flujo de electrones a través de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los puntos rojos representan la formación de especies reactivas de oxígeno (22).

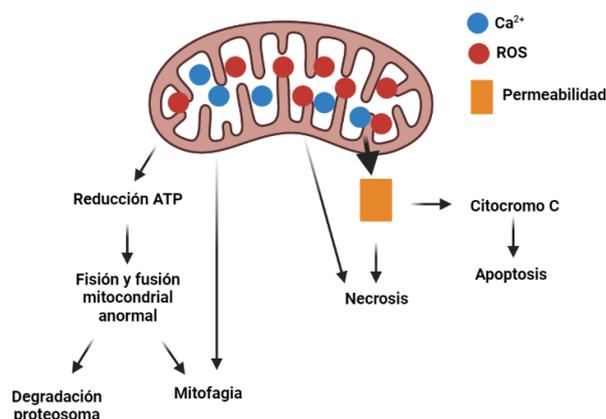
La monoaminoxirreductasa (MAO) es una enzima oxirreductasa que desamina las catecolaminas y se encuentra en la MME. Se relaciona con la CMTE ya que la MAO se une a la flavina adenina dinucleótido, actuando como transportador, para posteriormente ceder los electrones al complejo IV de la CMTE (23).

La principal fuente intracelular de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es la mitocondria, debido a esta transferencia de electrones durante la producción de ATP. Las ROS son moléculas orgánicas e inorgánicas de tamaño muy pequeño que presentan un electrón desapareado en el orbital más externo (24). Por tanto, son inmensamente reactivas. Su formación se debe al subproducto del metabolismo del oxígeno, principalmente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y son tres las especies: anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el hidroxilo ( $HO^-$ ). Sobre todo, su formación se produce en los complejos I y III, siendo la producción en el complejo II disminuida a causa de la estructura de la enzima (19,20). Asimismo, la MAO genera  $H_2O_2$  citosólico que es transportado a la CTME, aumentando la formación de ROS y pudiendo inducir daño a diferentes proteínas y lípidos (23).

Diversos sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa...) y no enzimáticos (melatonina, vitamina D, vitamina E...) regulan la concentración celular de ROS. Por tanto, la presencia de desequilibrios entre la producción y los mecanismos antioxidantes pueden ocasionar estrés oxidativo (21,24).

### **1.2.2 Disfunción mitocondrial en los accidentes cerebrovasculares**

Las mitocondrias son las principales responsables de la producción de energía en el cerebro y regulación de la homeostasis celular. En los ACVs se han detectado alteraciones en la CTEM que se relacionan con la disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, formación de ROS, inflamación y apoptosis (**Figura 2**) (25). Por tanto, las alteraciones en la CTEM parecen ser determinantes en la patogénesis y progreso del ACV (26).



**Figura 2. Disfunción mitocondrial en el ACV.** Fuente: Propia

Tras la isquemia se produce la alteración de la cadena, ocasionando una disminución de la fosforilación oxidativa, producción de ATP y aumento de radicales libres. En consecuencia, las macromoléculas son oxidadas; así como las vías de señalización (25). Además, se han observado disminuciones en la expresión de los genes que codifican las proteínas de la CTEM; así como mutaciones en el ADN mitocondrial que se asocian a un incremento del riesgo de padecer ACVs (27).

En los ACVs tanto agudos como crónicos, la actividad de los complejo I, II, III y IV se encuentra disminuida, repercutiendo en el metabolismo energético mitocondrial, lo que conlleva una reducción de la síntesis de ATP y aumento de la liberación de ROS (28). El aumento de estos niveles y la apertura de canales de calcio, los cuales aumentan la permeabilidad de la membrana y liberación del citocromo, pueden conducir a la muerte neuronal (29).

Asimismo, las alteraciones en la CTEM se relacionan con la activación de procesos inflamatorios. Los genes inflamatorios se encuentran incrementados en pacientes con ACVs y su activación participa en la disfunción mitocondrial y aumento del estrés oxidativo (30).

### **1.3 ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA FUNCIONAL: EVIDENCIAS Y EFECTOS PRODUCIDOS EN LA MITOCONDRIA**

#### **1.3.1 Estimulación eléctrica funcional**

La estimulación eléctrica funcional (FES), es un tipo de estimulación eléctrica la cual mediante trenes de impulso provoca potenciales de acción en las motoneuronas que inervan un músculo o directamente sobre este, originando así contracciones musculares (31). En consecuencia, es

posible inducir diferentes movimientos que el paciente no puede realizar debido a las alteraciones en la función motora, producidas por el ACV (32).

Los efectos de la FES, a pesar de aplicarse de manera local, pueden extenderse a nivel funcional (mejora de la función motora de las extremidades, mejora en la realización de las AVDs, mejora cardiovascular...) (33) y a nivel neurofisiológico (disminución de la difusión axonal, aumento de la activación de las áreas motoras corticales...) (33).

La tecnología FES multi-campo se basa en la utilización de electrodos multi-campo superficiales para mejorar la selectividad de estimulación, colocación y configuración de los electrodos. Los electrodos están formados por numerosos campos de estimulación que, a su vez, pueden ser estimulados de manera aislada originando un determinado patrón (34).

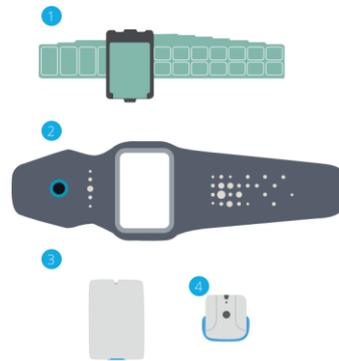
Los dispositivos permiten el uso en sesiones de rehabilitación activa pudiendo realizar multitud de ejercicios y aumentar el número de activaciones y contracciones musculares por sesión; así como estimular la realización de los movimientos ausentes, promoviendo la neuroplasticidad y reaprendizaje motor (35).

Por un lado, el dispositivo Fesia Grasp (Fesia Technology, Donostia-San Sebastián, España) (**Figura 3**), se utiliza para la rehabilitación de la extremidad superior y presenta un electrodo multi-campo. El electrodo está formado por 32 cátodos y 8 ánodos, pudiendo aislar ocho movimientos primitivos: flexión de muñeca, extensión de muñeca, flexión de pulgar, extensión de pulgar, flexión del índice, extensión del índice, flexión de los dedos 3,4,5 y extensión de los dedos 3,4,5. Los movimientos primitivos dan lugar a cuatro movimientos funcionales diferentes. Los parámetros de estimulación pueden variar: la intensidad entre 0 y 60 miliamperios; la frecuencia entre 0 y 40 hercios; y el ancho de pulso entre 150 y 300 microsegundos (36).



**Figura 3. Dispositivo Fesia Grasp.** A: banda textil ajustable; B: estimulador; C: electrodo multi-campo (37).

Por otro lado, el dispositivo Fesia Walk (Fesia Technology, Donostia-San Sebastián, España) (**Figura 4**), es usado como tratamiento rehabilitador de la extremidad inferior y cuenta también con un electrodo multi-campo. El electrodo está compuesto por 16 cátodos y 4 ánodos que estimulan los nervios peroneo común y tibial. De esta forma, se produce la flexión plantar y dorsal en las fases correspondientes de la marcha (detectadas por el sensor inercial). Los parámetros de estimulación pueden variar: la intensidad entre 0 y 60 miliamperios; la frecuencia entre 0 y 40 hercios; y el ancho de pulso entre 150 y 300 microsegundos (38).



**Figura 4. Dispositivo Fesia Walk.** 1: electrodo; 2: banda textil; 3: estimulador; 4: sensor inercial (37).

### 1.3.2 Impacto de la estimulación eléctrica funcional en la mitocondria

Cualquier cambio en las mitocondrias afecta directa o indirectamente a la función del músculo esquelético; por lo que la disminución del potencial de membrana mitocondrial puede ser precursor de daño oxidativo celular (39).

La FES mediante la inducción de señales, produce un aumento de los estímulos contráctiles en el músculo esquelético, lo que conduce a modificaciones bioquímicas y, por tanto, a la biogénesis mitocondrial (40). Este suceso también puede ser ocasionado por el incremento de genes relacionado con la síntesis de proteínas mitocondriales (41). En consecuencia, se produce un aumento de la síntesis de ATP, de la actividad oxidativa y de la regulación de enzimas antioxidantes (42). A su vez, puede producir vasodilatación arteriolar, aumentando la capacidad de perfusión del músculo tratado. De esta forma, se mejora la capacidad mitocondrial para producir energía en presencia de oxígeno, dando lugar a un incremento en la fuerza muscular y movilidad de los pacientes (43).

Igualmente, se ha observado que puede inducir la regulación de la autofagia. Este fenómeno podría producirse mediante la vía de señalización Sirt3, principalmente y de manera secundaria a través de la Sirt1 y quinasa. La Sirt3 es una desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>

que se encuentra en la mitocondria y regula numerosas enzimas antioxidantes. Además, desacetila los componentes de la cadena de transporte de electrones, incluyendo NADHDH, SDH y el complejo III, aumentando la eliminación de ROS (44).

Finalmente, tras el ACV la disminución de ATP y despolarización mitocondrial es esencial conseguir un óptimo transporte mitocondrial axonal para poder satisfacer las demandas metabólicas. La FES, en función de la frecuencia, consigue mejorar el transporte mitocondrial y puede ocasionar la regeneración central y periférica axonal (45).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Los ACVs cursan con trastornos motores, consecuencia de lesiones producidas en las neuronas implicadas en el control muscular. La instauración del síndrome provoca, a nivel mitocondrial, alteraciones en la CTEM dando lugar a la inducción del estrés oxidativo y aumento de los niveles de ROS. La terapia basada en la FES podría restaurar la función mitocondrial a través de diferentes mecanismos: eliminación de ROS, aumento de la síntesis de ATP e incremento de la biogénesis mitocondrial. De este modo, se mejoraría la función de la CTEM y se obtendrían mejoras en la función motora.

Así, el objetivo general de este trabajo es determinar el efecto de la FES en la función motora de pacientes que han sufrido accidentes cerebrovasculares, así como sobre la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, en muestras de sangre periférica procedente de pacientes con secuelas motoras. Los objetivos específicos del trabajo son:

1. Caracterizar el efecto de la estimulación eléctrica funcional en la capacidad motora funcional de pacientes que han padecido accidentes cerebrovasculares.
2. Investigar el efecto de la estimulación eléctrica funcional sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial en pacientes que han padecido accidentes cerebrovasculares.
3. Investigar la posible correlación entre la actividad mitocondrial (pre- y postratamiento) y el factor pronóstico de mejora de la función motora en pacientes con ACVs.

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.1 TIPO DE ESTUDIO**

Este proyecto es un estudio cuasiexperimental sin fármacos. El protocolo se ha desarrollado bajo las recomendaciones del Comité de Bioética Asistencial (CEA) del Hospital Universitario de Donostia (Donostia, San Sebastián, España) y de acuerdo con la Ley 14/2007 de la Investigación Biomédica, Principios Éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos evaluables.

El estudio ha sido llevado a cabo en un marco de colaboración entre la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Leioa, Bizkaia, España), IMG Pharma Biotech S.L. (Derio, Bizkaia, España) y Fesia Technology S.L. (Donostia/San Sebastián, Gipuzkoa, España).

### **3.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SUJETOS**

#### **3.2.1 Criterios de inclusión**

Se consideraron sujetos a estudio todos los pacientes, hombres y mujeres, mayores de edad que estuvieran diagnosticados de ACV en estado crónico o agudo, que no hubieran recibido terapia rehabilitadora en los últimos 6 meses y fueran susceptibles de responder a terapias con FES mediante los dispositivos Fesia Grasp/Fesia Walk.

#### **3.2.2 Criterios de exclusión**

No se incluyeron aquellos pacientes con información insuficiente respecto a su edad, diagnóstico, antecedentes médicos y fecha fin de su última terapia rehabilitadora.

#### **3.2.3 Criterios de eliminación**

Los pacientes diagnosticados o que manifestaron alguna otra enfermedad concomitante del SNC y/o que hubieran recibido terapia rehabilitadora en los 6 meses previos al inicio del estudio.

Una vez se reclutaron los sujetos se procedió a informar al paciente sobre el procedimiento y firmar el consentimiento informado.

### **3.3 TAMAÑO MUESTRAL**

El tamaño muestral fue calculado para un período comprendido entre octubre de 2022 y junio de 2024 (proyecto Trabajo Fin de Grado (TFG) y Trabajo Fin de Máster (TFM)).

Aceptando un riesgo  $\alpha$  de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, se precisan 33 sujetos ( $n=33$ ) para detectar una diferencia igual o superior a las 0,15 unidades de ratio de

actividad enzimática del complejo I y IV en comparación con la actividad del citrato sintetasa, estudiada con espectrometría de ultravioleta-visible (46). Se asume que la desviación estándar común es de 0,21 para dicha medida. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%. En el período comprendido entre enero de 2023 y marzo de 2023 (TFG) fue posible reclutar una muestra de n=4 pacientes y n=4 voluntarios sanos.

### 3.4 SUJETOS A ESTUDIO

Tras el reclutamiento se procedió a registrar los datos sociodemográficos y clínicos de cada sujeto (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Datos sociodemográficos y clínicos de los sujetos a estudio.**

VARIABLES	DATOS
<b>Sexo</b> (n, (%))	2 (50%) Mujer 2 (50%) Hombre
<b>Edad</b> (año, media, $\pm$ SEM)	61.5 $\pm$ 13.3
<b>Edad inicio enfermedad</b> (año, media, $\pm$ SEM)	51.75 $\pm$ 12.9
<b>Tiempo desde diagnóstico</b> (año, media, $\pm$ SEM)	8,75 $\pm$ 4.6
<b>Tipo de ACV</b> (n, (%))	2 (50%) ACV isquémico izquierdo 1 (25%) ACV isquémico cardioembólico izquierdo 1 (25%) ACV isquémico derecho de causa hemorrágica periférica
<b>Tiempo desde último tratamiento rehabilitador</b> (n, (%))	4 (100%) > 6 meses
<b>Comorbilidad cardiovascular</b> (n, (%))	3 (75%)
<b>Comorbilidad endocrina</b> (n, (%))	1 (25%)
<b>Comorbilidad visual</b> (n, (%))	3 (75%)
<b>Comorbilidad auditiva</b> (n, (%))	1 (25%)
<b>Fármacos anticoagulantes</b> (n, (%))	2 (50%)
<b>Fármacos hipoglucemiantes</b> (n, (%))	1 (25%)

ACV: Accidente cerebrovascular

### 3.5 INTERVENCIÓN

Tras el reclutamiento, en primer lugar, se realizó la valoración funcional y motora de cada participante, mediante diferentes escalas y test funcionales validados: Fugl-Meyer, Berg, escala de Daniels, escala de Ashworth y Sit to Stand. Los datos fueron recogidos por el mismo fisioterapeuta. A su vez, se realizó a cada participante la extracción sanguínea (pretratamiento)

A continuación, todos los participantes se sometieron a 12 sesiones de FES con Fesia Walk y/o Fesia Grasp. Todas las sesiones de rehabilitación tuvieron una duración de 60 minutos y

se administraron 2 veces por semana, dejando un mínimo de 48 horas entre ellas. Las sesiones fueron realizadas por el mismo fisioterapeuta.

Finalmente, se tomaron de nuevo las mediciones de la función motora y la extracción sanguínea (postratamiento) (**Figura 5**).

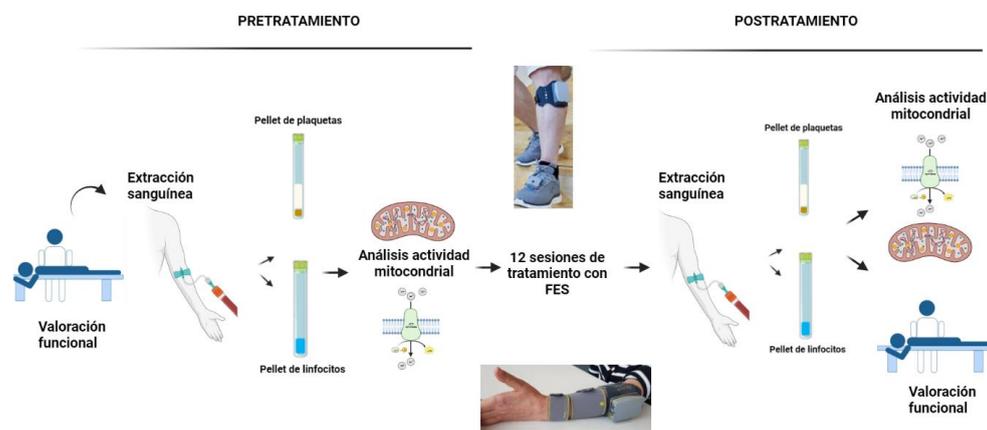


Figura 5. Esquema del procedimiento llevado a cabo para la realización del ensayo. Fuente: Propia

### 3.6 ESCALAS DE VALORACIÓN

#### FUGL MEYER

La prueba Fugl-Meyer se utiliza como herramienta de evaluación estandarizada en pacientes con ACVs, para medir su capacidad motora y sensorial. Se compone de 5 secciones correspondientes a distintos aspectos de la función motora y sensorial: funcionalidad de miembro superior e inferior, sensibilidad, equilibrio y coordinación. Cada una de ellas está compuesta por diversas tareas cuya puntuación puede oscilar de 0 (capacidad limitada) a 2 (capacidad normal) pudiendo obtener un máximo de 226 puntos; 100 de los cuales corresponden a la sección de la función motora (47).

#### ESCALA DE ASWORTH

La escala de Asworth es usada como instrumento de evaluación en pacientes con alteraciones neurológicas, permitiendo medir su tono muscular. Para ello, se realiza un movimiento pasivo articular y se observa la resistencia que se opone al movimiento. Su puntuación varía entre 0 (tono muscular normal) y 4 (tono muscular alto con rigidez) (48).

### **ESCALA DE DANIELS**

La escala de Daniels sirve como herramienta de evaluación para determinar la fuerza muscular en pacientes con alteraciones neuromusculares. El evaluador realiza movimientos específicos para cada músculo o grupo muscular contra la gravedad y con resistencia; obteniendo puntuaciones desde 0 (ausencia de contracción muscular) a 5 (contracción muscular normal contra resistencia máxima) (49).

### **ESCALA DE BERG**

La escala de Berg se emplea como prueba de evaluación del equilibrio en personas mayores y/o con alteraciones neurológicas, especialmente hemipléjicas. La escala consta de 14 tareas que el paciente debe realizar pudiendo obtener una puntuación de 0 (incapacidad) a 4 (capacidad normal). De esta forma, la puntuación total de la escala es de 56 puntos (excelente equilibrio); pudiéndose obtener puntuaciones entre 45 a 56 para considerarse una deambulación independiente (50).

### **RANGO DE MOVIMIENTO ARTICULAR**

El rango de movimiento articular (ROM) corresponde a los grados de movimiento que realiza una articulación concreta y es medido mediante goniometría (°). En clínica se usa para evaluar la función articular de pacientes con afecciones musculoesqueléticas (51).

### **SIT TO STAND**

La prueba de Sit to Stand evalúa la fuerza y resistencia de la musculatura de la extremidad inferior. En pacientes con ACV se usa para conocer la capacidad motora y funcional, así como el progreso durante su rehabilitación. El paciente parte de una posición de sedestación con espalda apoyada sobre el respaldo de la silla. La orden que debe ejecutar el paciente es la de levantarse y volver a la sedestación, 5 veces. La prueba se repite tras 1 minuto de descanso. En ambas ocasiones, se registra el tiempo en segundos que tarda el paciente en realizar la prueba (52).

### **3.7 REACTIVOS**

La 3,3'-diaminobencidina (DAB), el citocromo C de corazón equino, el nitro azul de tetrazolio (NBT), la azida sódica, el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la albúmina de suero bovino (BSA), la triptamina, la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa

(NADH) y el succinato sódico dibásico (SDH) fueron adquiridos a Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.).

### **3.8 EXTRACCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA**

La obtención de muestras se llevó a cabo mediante la extracción de sangre venosa periférica, mediante venopunción y realizada por una enfermera de la Universidad Docente de Donostia (Donostia, San Sebastián, España). Se extrajeron dos tubos de 4.5 mL a cada paciente, para evitar la coagulación, los tubos utilizados contenían citrato sódico (BD Vacutainer®, BD-Plymouth, Reino Unido). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su posterior procesamiento.

### **3.9 AISLAMIENTO DE PLAQUETAS Y CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS**

El aislamiento se realizó mediante el uso de un gradiente de Ficoll (dBiolab, Barcelona, España) técnica optimizada en IMG Pharma Biotech S.L. (**Figura 6**). El volumen de sangre extraído en la venopunción se mezcló con un volumen igual de solución salina balanceada (pH 7.4). Seguidamente, la mezcla se depositó sobre el mismo volumen de Ficoll, formando dos fases bien diferenciadas. El gradiente se centrifugó (Multifuge 3S-R con rotor 75006445, Heraeus, Alemania) durante 40 minutos a 400 g y a temperatura ambiente. Tras este proceso, se pudo observar la formación de tres fases: la superior, de color amarillento, correspondiente a las plaquetas; seguida de otra fase formada por un halo blanco, a las células mononucleares periféricas; y la inferior, de color rojo, a la hemoglobina sedimentada.

La primera capa (plaquetas) se transfirió a nuevos tubos y se centrifugó (Multifuge 3S-R con rotor 75006445, Heraeus, Alemania) durante 15 minutos a 14000 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet que se obtuvo correspondía a las plaquetas. Se conservó a -80°C hasta su posterior análisis.

La segunda capa (células mononucleares periféricas) se transfirió a tubos nuevos, se añadieron 3 volúmenes de solución salina balanceada, para realizar el lavado de posibles restos de Ficoll, y se centrifugó (Multifuge 3S-R con rotor 75006445, Heraeus, Alemania) durante 15 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente. De esta forma, tras la centrifugación, se formó un pellet de células mononucleares periféricas que se conservó a -80°C hasta su posterior análisis (**Figura 6**).

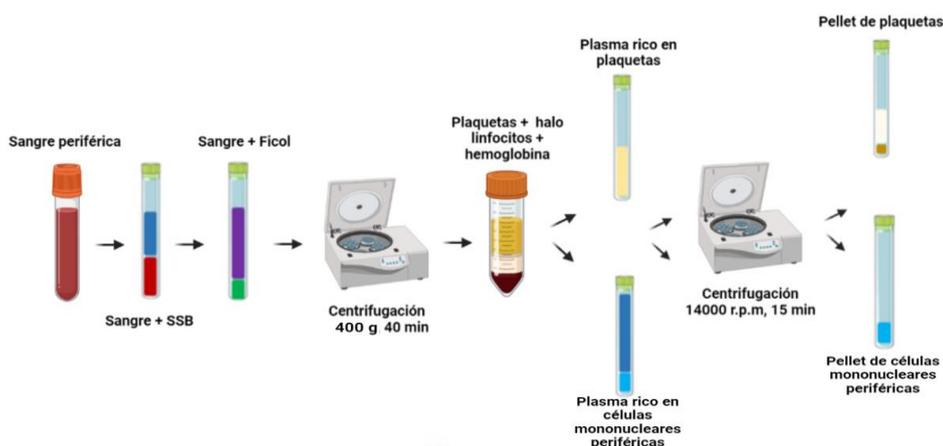


Figura 6. Esquema del proceso para realizar el aislamiento de plaquetas y células mononucleares periféricas, a partir de una muestra de sangre periférica. SSB: Solución Salina Balanceada. Fuente: Propia.

### 3.10 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas se realizó para cada muestra siguiendo el método de Bradford (53), basado en la unión del azul de Coomassie a las proteínas presentes en la muestra, pudiendo determinar su concentración (**Figura 7**). Para ello, cada muestra se diluyó (1:20) en tampón fosfato (0,5 mM; pH 7.6), evitando así posibles interferencias de otros componentes presentes en la muestra. Para poder determinar la cantidad de proteínas, se utilizó una curva de calibración interna de BSA. A cada 10  $\mu$ L de muestra se adicionaron 250  $\mu$ L de reactivo de Bradford. A continuación, la mezcla se incubó durante 15 minutos en agitación y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm, mediante el uso de un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific®, Waltham, Massachussets, EE. UU.)

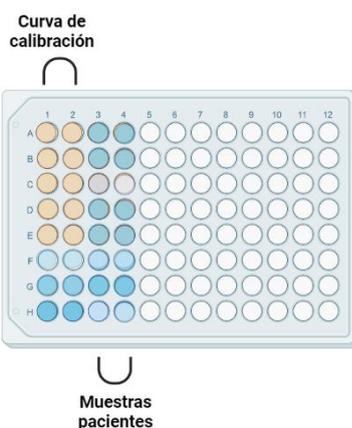


Figura 7. Determinación de proteínas mediante método Bradford. Las dos primeras columnas representan la curva de calibración interna de BSA. La tercera y cuarta columna representan diferentes muestras de diferentes pacientes. Fuente: Propia.

### **3.11 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR NADH DESHIDROGENASA EN SANGRE PERIFÉRICA**

El estudio de la actividad del complejo I se realizó mediante la inducción de NADHDH y la formación de superóxido en células mononucleares periféricas. Para ello, se utilizó como indicador el NBT que participa en las reacciones redox aceptando electrones. De esta forma, en esta reacción, el NADH se oxida en el complejo I a  $\text{NAD}^+$  y los dos electrones generados durante la oxidación, viajan al transportador dUQ. Los electrones desviados a la formación de superóxido son captados por el cromógeno NBT, reduciéndose y formando el compuesto insoluble azul oscuro (formazán) (54).

Para la determinación de la formación de superóxido inducida por NADHDH, las células mononucleares periféricas (0.1 mg/mL) fueron incubados en NADH (0.35 mM), NBT (0.5 mg/mL) y dUQ (100  $\mu\text{M}$ ), en tampón fosfato (5mM; pH 7.4), en presencia o ausencia de azida sódica (10 mM). La reacción comienza con la adición de las células mononucleares periféricas. La formación de superóxido fue medida en intervalos de 2 minutos, durante 15 minutos a una longitud de onda de 595 nm, en un lector de placas de microtitulación, Multiskan FC (Thermo Scientific®, Waltham, Massachussets, EE. UU.).

### **3.12 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR SUCCINATO DESHIDROGENASA EN SANGRE PERIFÉRICA**

El estudio de la actividad del complejo II se realizó mediante la inducción de la SDH y la formación de superóxido en células mononucleares periféricas y plaquetas. Para ello, se utilizó como indicador el NBT. El succinato es transformado a fumarato a través del complejo mitocondrial II, produciendo dos electrones que viajan a la ubiquinona (UQ), la cual los cede para formar el anión superóxido. El NBT se reduce al captar los iones superóxidos y forma su compuesto insoluble azul oscuro (formazán) (55).

Para la determinación de la formación de superóxido inducida por la SDH, las células mononucleares periféricas y plaquetas (0.1 mg/mL) fueron incubados en SDH (10 mM), NBT (0.5 mg/mL), dUQ (100  $\mu\text{M}$ ), en tampón fosfato (5mM; pH 7.4), en presencia o ausencia de azida sódica (10 mM). La reacción comienza cuando se adicionan las células mononucleares periféricas. La formación de superóxido fue medida en intervalos de 5 minutos durante 300 minutos a una longitud de onda de 595 nm, en un lector de placas de microtitulación, Multiskan FC (Thermo Scientific®, Waltham, Massachussets, EE. UU.).

### **3.13 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR GLICEROALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA EN SANGRE PERIFÉRICA**

La actividad de la lanzadera mitocondrial G3PDH se estudió mediante la formación de superóxido en células mononucleares periféricas. Durante la reacción el G3P se oxida a 1,3-bifosfoglicerato en presencia de un cofactor de reducción y los electrones son transferidos al NBT que se reduce para formar su forma insoluble formazán (56)

Para la determinación de la formación de superóxido inducida por G3PDH, las células mononucleares periféricas (0.1 mg/mL) fueron incubados en G3PDH (10 mM), NBT (0.5 mg/mL), dUQ (100  $\mu$ M), en tampón fosfato (5mM; pH 7.4), en presencia o ausencia de azida sódica (10 mM). La reacción comienza cuando se adicionan las células mononucleares periféricas. La formación de superóxido fue medida en intervalos de 5 minutos durante 300 minutos a una longitud de onda de 595 nm, en un lector de placas de microtitulación, Multiskan FC (Thermo Scientific®, Waltham, Massachussets, EE. UU.).

### **3.14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA EN SANGRE PERIFÉRICA**

La actividad mitocondrial del complejo IV se estudió mediante la inducción del citocromo C oxidasa (CCo) y la oxidación del DAB en células mononucleares periféricas. Para ello, el DAB se usó como dador de electrones, el cual reduce el citocromo C y produce un precipitado de color marrón que determina la actividad del complejo IV (57).

Para la determinación de la actividad de la CCo, las células mononucleares periféricas (0.1 mg/mL) fueron incubados con DAB (0.05%) en una solución de tampón fosfato (5mM; pH 7.4), en presencia de citocromo C (0.01%). La reacción comienza con la adición de las células mononucleares periféricas. La oxidación del DAB fue medida cada 2 minutos, durante 214 minutos, espectrofotométricamente a 450 nm, en un lector de placas de microtitulación, Multiskan FC.

### **3.15 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDA POR MAO EN SANGRE PERIFÉRICA**

La actividad de la MAO se estudió mediante la formación de superóxido y la oxidación de la triptamina, en células mononucleares periféricas y plaquetas. Para este fin, se usó el NBT

como aceptor de electrones. La oxidación de la triptamina provocó la transferencia de electrones al NBT. Durante la reacción, los grupos funcionales que presenta la triptamina, debido al anillo aromático indol, forman enlaces covalentes con el NBT reducido; dando lugar a la formación del complejo insoluble formazán (color azul oscuro) (58).

Para determinar la actividad de la MAO, las células mononucleares periféricas y plaquetas (0.1 mg/mL) fueron incubados en una solución que contiene NBT (0.5 mg/mL), triptamina (5 mM), duQ (100  $\mu$ M), en tampón fosfato (5mM; pH 7.6), en presencia o ausencia de azida sódica (10 mM). La reacción comienza con la adición de las células mononucleares periféricas o plaquetas. La formación de superóxido fue medida cada 2 minutos, durante 180 minutos, espectrofotométricamente a 595 nm, en un lector de placas de microtitulación, Multiskan FC (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

### 3.16 TRATAMIENTO DE DATOS

Las medidas de la actividad mitocondrial y formación de superóxido (voluntarios sanos y pacientes pre- y postratamiento) fueron obtenidas mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible, en datos de absorbancia. Las velocidades de cada dato (voluntarios sanos, pre- y postratamiento) se obtuvieron a partir de un modelo de regresión lineal de ensayos de formación de superóxido; determinando así las pendientes para cada uno de los datos (voluntarios sanos, pre- y postratamiento). El tratamiento y el análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software Excel (versión 17.0, Microsoft, EE. UU.) y GraphPad (versión 9.2, GraphPad, La Jolla, California, EE. UU.). La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk, con  $\alpha$  fijado en 0.05. La comparación entre voluntarios sanos y pacientes pretratamiento se realizó mediante el análisis estadístico Mann-Whitney, para los datos no paramétricos, y la prueba t-Student no pareada para los datos paramétricos, ambos análisis con  $\alpha$  fijado en 0.05. La comparación de la formación entre pacientes pre- y postratamiento se llevó a cabo mediante la prueba t-Student pareada, para los datos paramétricos, y el análisis estadístico Wilcoxon para los datos no paramétricos; ambos análisis con  $\alpha$  fijado en 0.05.

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \quad (1)$$

$$Y_1 = \bar{x} - DF \times SD \quad Y_2 = \bar{x} + DF \times SD$$

\*SD: desviación estándar; DF: factor de desviación; y CV: coeficiente de variación.

La identificación de los valores atípicos se realizó aplicando la Ecuación 1.

Los puntos se identificaron como valores atípicos y se excluyeron si Y1 es mayor que el punto analizado o Y2 es menor que el punto examinado. En el análisis se utilizó un factor de desviación de 1,25. El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ .

Posteriormente, fueron representados en GraphPad (versión 9.2, GraphPad, La Jolla, California, EE. UU) como valores de formación neta (D.O).

El tratamiento y análisis de los datos de las escalas de valoración motora y funcional de fisioterapia se llevó a cabo mediante el software Excel (versión 17.0, Microsoft, EE. UU.) y GraphPad (versión 9.2, GraphPad, La Jolla, California, EE. UU). La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk con  $\alpha$  fijado en 0.05. Para los datos con una distribución no paramétrica se realizó el análisis estadístico Wilcoxon con  $\alpha$  fijado en 0.05. El análisis de los datos con distribuciones paramétricas se realizó mediante una prueba t-Student pareada o no pareada de acuerdo con las comparaciones a realizar.

La correlación entre los datos de la actividad mitocondrial y la valoración funcional y motora se representó en el programa Orange (versión 3, GLP, Liubliana, Eslovenia) tras agruparlos de manera jerárquica basándose en la correlación de Pearson. Para comprobar que la agrupación no era casual, se seleccionaron aquellas correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ).

### **3.17 VARIABLES**

- La generación de especies reactivas de oxígeno producidas por los complejos I, II y IV, de la lanzadera de electrones mitocondrial y de la MAO debido a los inhibidores selectivos de estos.
- La mejora clínica de la función motora alcanzada respecto a cada paciente, de manera individual. Esta variable se midió mediante diferentes escalas y test funcionales validados (Fugl-Meyer, Berg, escala de Daniels, escala de Ashworth y Sit to Stand).

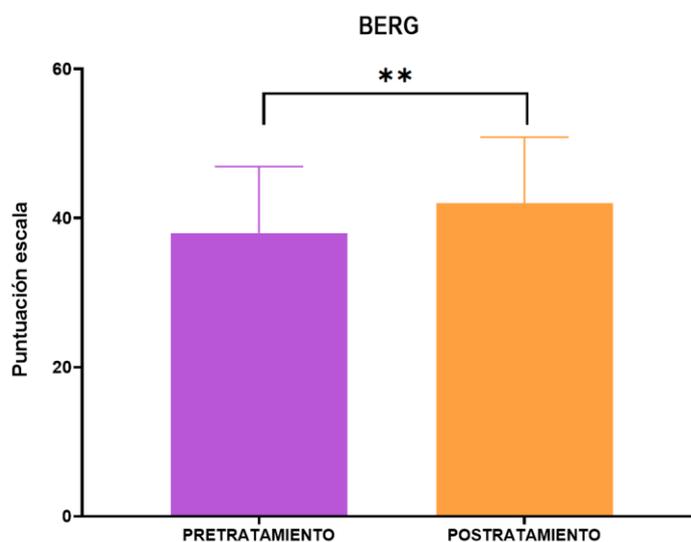
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 VALORACIÓN FUNCIONAL Y MOTORA DE LA MUSCULATURA**

Para evaluar el efecto de la FES en la función motora de los pacientes con ACVs, se realizó la valoración funcional, mediante diferentes escalas y test validados, de cada paciente antes y después del tratamiento para posteriormente, conocer los cambios producidos postratamiento.

### 4.1.1 Berg

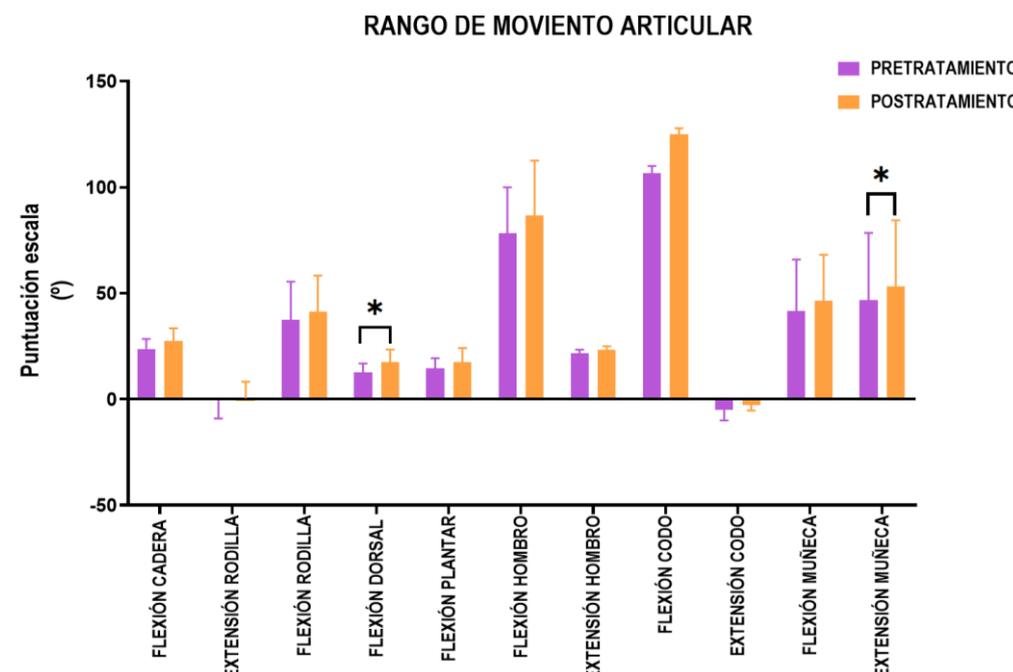
Se observó una mejora significativa en el equilibrio de los pacientes tras las 12 sesiones de tratamiento, mediante la evaluación de la escala de Berg ( $14.34 \pm 5.59\%$ ,  $p < 0.01$ ) (**Figura 8**).



**Figura 8. Puntuación en la escala de Berg obtenida en los pacientes pre- y postratamiento.** Puntuación de la escala de Berg pre- y postratamiento expresado como media  $\pm$ EEM (t-Student pareado,  $**p < 0.01$ )

### 4.1.2 Rango de movimiento articular

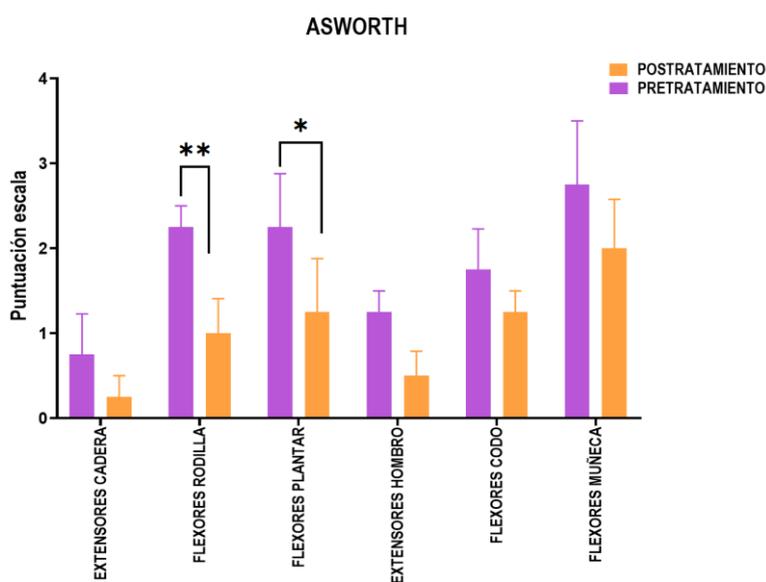
Se observó una tendencia de mejora en los grados de movimiento articular (ROM), tras la administración de FES para todos los movimientos. Se observaron mejoras estadísticamente significativas para los movimientos de extensión de muñeca ( $28.88 \pm 19.75\%$ ;  $p < 0.05$ ) y flexión dorsal ( $31.25 \pm 11.78\%$ ;  $p < 0.05$ ) (**Figura 9**).



**Figura 9. Rango de movimiento articular (en grados) obtenido pre- y postratamiento.** ROM pre- y postratamiento expresado como media  $\pm$ SEM. Para los datos con una distribución paramétrica se llevó a cabo el análisis estadístico mediante un t-Student pareado con  $\alpha$  fijado en 0.05. \* $p < 0.05$ .

#### 4.1.3 Asworth

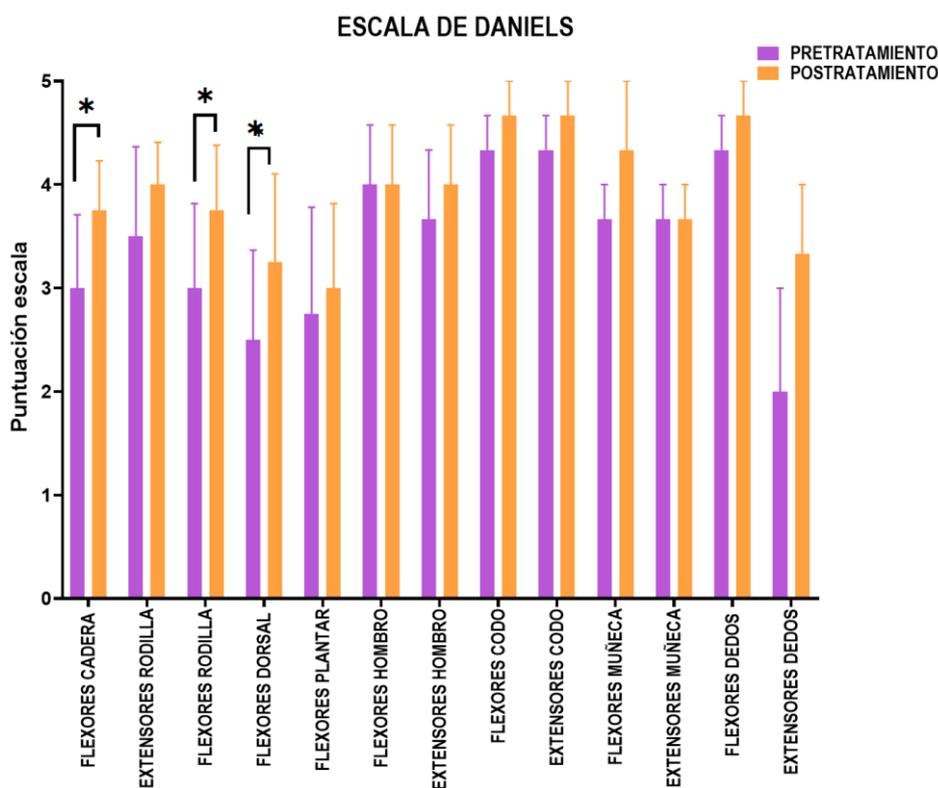
El efecto de la FES en el tono muscular (espasticidad) de los pacientes se llevó a cabo mediante la escala de Asworth. Se observó, de manera general, una mejora tras el tratamiento, con cambios significativos en los flexores plantares ( $-56.25 \pm 14.43\%$ ;  $p < 0.05$ ) y flexores de rodilla ( $-58.33 \pm 14.43\%$ ;  $p < 0.01$ ) (**Figura 10**).



**Figura 10. Puntuación obtenida en la escala de Asworth pre- y postratamiento.** Puntuación obtenida en la escala de Asworth pre- y postratamiento expresado como media  $\pm$ EEM. Para los datos con una distribución paramétrica se llevó a cabo el análisis estadístico mediante t-Student pareado con  $\alpha$  fijado en 0.05. Los datos con una distribución no paramétrica fueron analizados mediante el test estadístico Wilcoxon con  $\alpha$  fijado en 0.05. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.4 Daniels

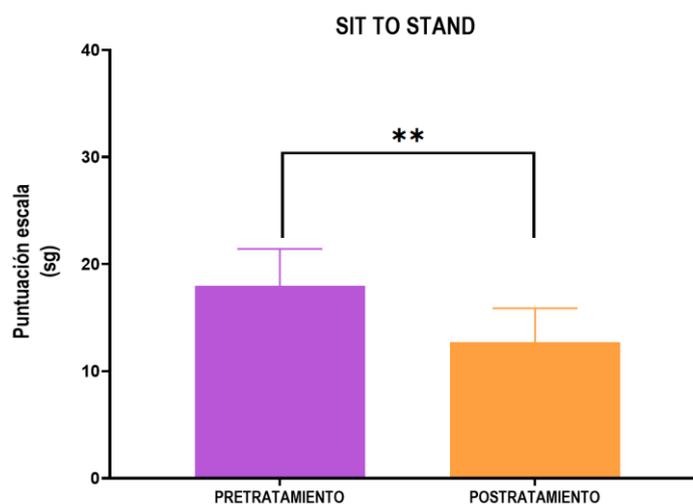
La fuerza de los pacientes pre- y postratamiento se evaluó mediante la escala de Daniels. Se observó una mejora en la musculatura, con cambios significativas en la fuerza de los flexores de cadera ( $33.33 \pm 11.79\%$ ;  $p < 0.05$ ), flexores de rodilla ( $41.67 \pm 20.97\%$ ;  $p < 0.05$ ) y flexores dorsales ( $19.44 \pm 10.02\%$ ;  $p < 0.05$ ) (**Figura 11**).



**Figura 11. Puntuación obtenida en la escala de Daniels pre- y postratamiento** Puntuación obtenida en la escala de Daniels pre- y postratamiento expresado como media  $\pm$ EEM. Para los datos con una distribución paramétrica se llevó a cabo el análisis estadístico mediante t-Student pareado con  $\alpha$  fijado en 0.05. \* $p < 0.05$ .

#### 4.1.5 Sit to Stand

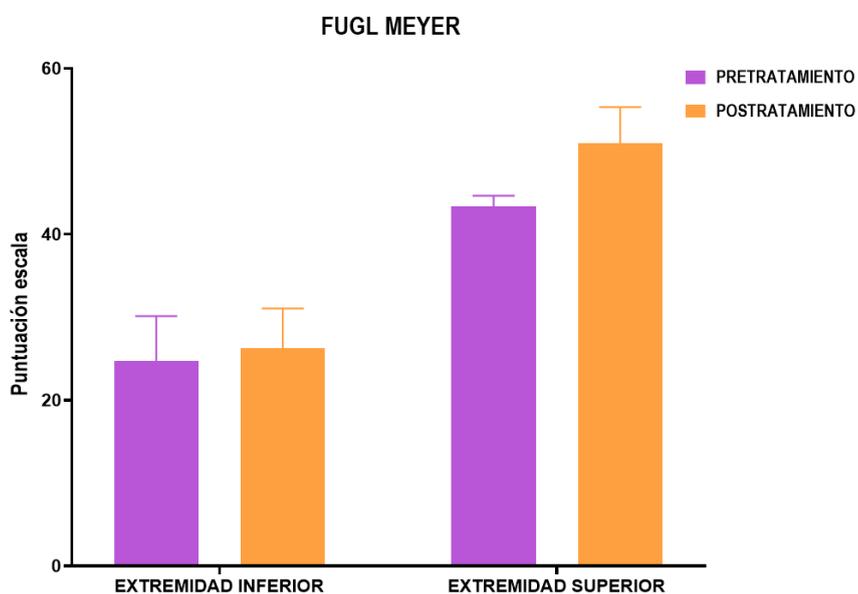
Los resultados en el test Sit to Stand mostraron mejoras significativas en la realización de la prueba, tras la administración del tratamiento, los pacientes tardaron menos tiempo (sg) en su ejecución ( $30.76 \pm 3.70\%$ ;  $p < 0.01$ ) (**Figura 12**).



**Figura 12. Segundos obtenidos en el Sit to Stand, por los pacientes pre- y postratamiento.** Segundos obtenidos al realizar la prueba pre- y postratamiento expresado como media  $\pm$ EEM. Para los datos con una distribución paramétrica se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado con  $\alpha$  0.05. \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.6 Fugl-Meyer

Los resultados obtenidos para la prueba de Fugl-Meyer mostraron una mejora tanto para la extremidad inferior ( $11.019 \pm 7.59\%$ ) como superior ( $17.84 \pm 10.58\%$ ); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 13**).



**Figura 13. Puntuación en la escala Fugl-Meyer obtenida por los pacientes pre- y postratamiento.** Puntuación de la escala de Fugl Meyer pre- y postratamiento expresado como media  $\pm$ EEM. Para los datos con una distribución paramétrica se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado con  $\alpha$  0.05.

## 4.2 ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

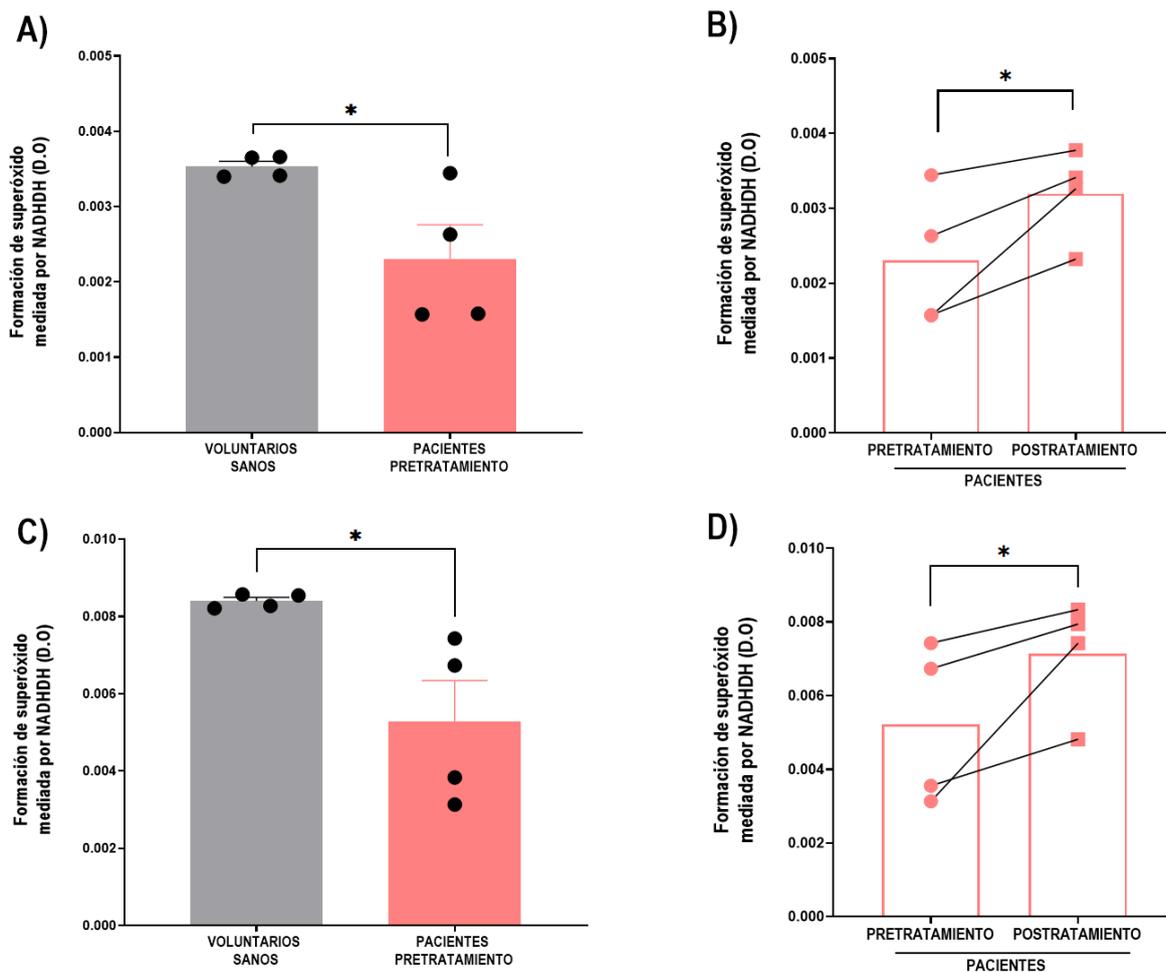
Para investigar el efecto de la FES sobre la CTEM, se determinó la formación de superóxido basal y máxima de cada complejo (complejo I, II y IV), de la lanzadera de electrones (G3PDH) y de la MAO mediante la inducción de su correspondiente sustrato, para cada paciente pre- y postratamiento y se comparó con la de voluntarios sanos.

### 4.2.1 Determinación de la formación de superóxido inducida por NADH deshidrogenasa en sangre periférica

Para evaluar la influencia del tratamiento con FES en la actividad mitocondrial del complejo I, se determinó la producción de la formación de superóxido basal inducida por NADHDH en voluntarios sanos y pacientes con ACV. Los resultados mostraron una disminución significativa de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento cuando eran comparados con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.0023 \pm 0.00045$  D.O, voluntarios:  $0.0035 \pm 0.000072$  D.O,  $p < 0.05$ ) (**Figura 14A**). No obstante, tras el tratamiento se observó que la formación había aumentado significativamente en todos los pacientes en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $39.94\% \pm 16.86$ ;  $0.0031 \pm 0.0002$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 14B**).

Asimismo, se determinó la producción máxima de formación de superóxido mediante el transportador dUQ y la inhibición del citocromo C, en presencia de azida sódica en pacientes y voluntarios sanos. Siguiendo la misma línea, los resultados mostraron una disminución significativa de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento cuando eran comparados con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.005 \pm 0.001$  D.O, voluntarios sanos:  $0.0083$  D. O  $\pm 0.0001$ ;  $p < 0.05$ ) (**Figura 14C**). No obstante, tras el tratamiento con FES se observó que la formación había aumentado significativamente ( $48.33\% \pm 19.55$ ), en todos los pacientes en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $0.0071 \pm 0.00079$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 14D**).

## CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS



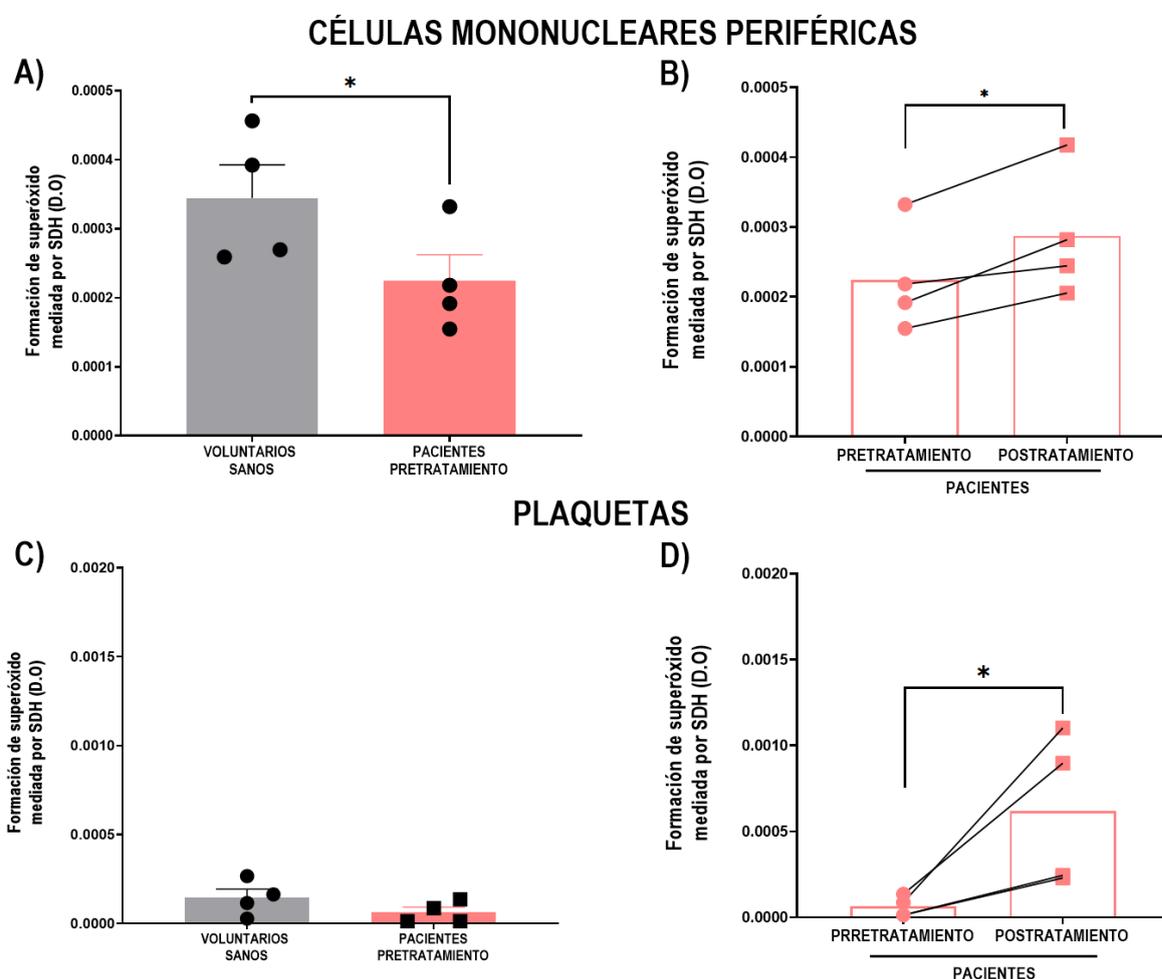
**Figura 14. Formación de superóxido mediada por NADHDH, en células mononucleares periféricas.** A) y B) Comparación de la formación basal de superóxido mediada por NADHDH entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento. C) y D) Comparación de la formación máxima de superóxido mediada por NADHDH, dUQ y azida sódica entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos paramétricos pre- vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos paramétricos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado con  $\alpha$  0.05. \* $p$  < 0.05.

### 4.2.2 Determinación de la formación de superóxido inducida por succinato deshidrogenasa en sangre periférica

Para conocer el efecto de la FES sobre el complejo II, se determinó la formación basal de superóxido mediada por la SDH, en pacientes pre- y postratamiento; así como en voluntarios sanos, en dos tipos celulares. En las células mononucleares periféricas se observó una disminución significativa de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en

comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento  $0.00022 \pm 0.000038$  D.O, voluntarios sanos:  $0.00034 \pm 0.000046$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 15A**). Tras el tratamiento, se observó que la formación había aumentado significativamente, en todos los pacientes en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $25.95\% \pm 6.73$ ;  $0.00029 \pm 0.000046$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 15B**).

En las plaquetas se observó un descenso, sin diferencias significativas, de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.000051 \pm 0.000016$  D.O, voluntarios sanos:  $0.00014 \pm 0.00003$  D.O) (**Figura 15C**). Tras las 12 sesiones de tratamiento con FES, todos los pacientes mostraron un incremento significativo en la formación de superóxido en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $490\% \pm 192$ ;  $0.00061 \pm 0.00022$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 15D**).

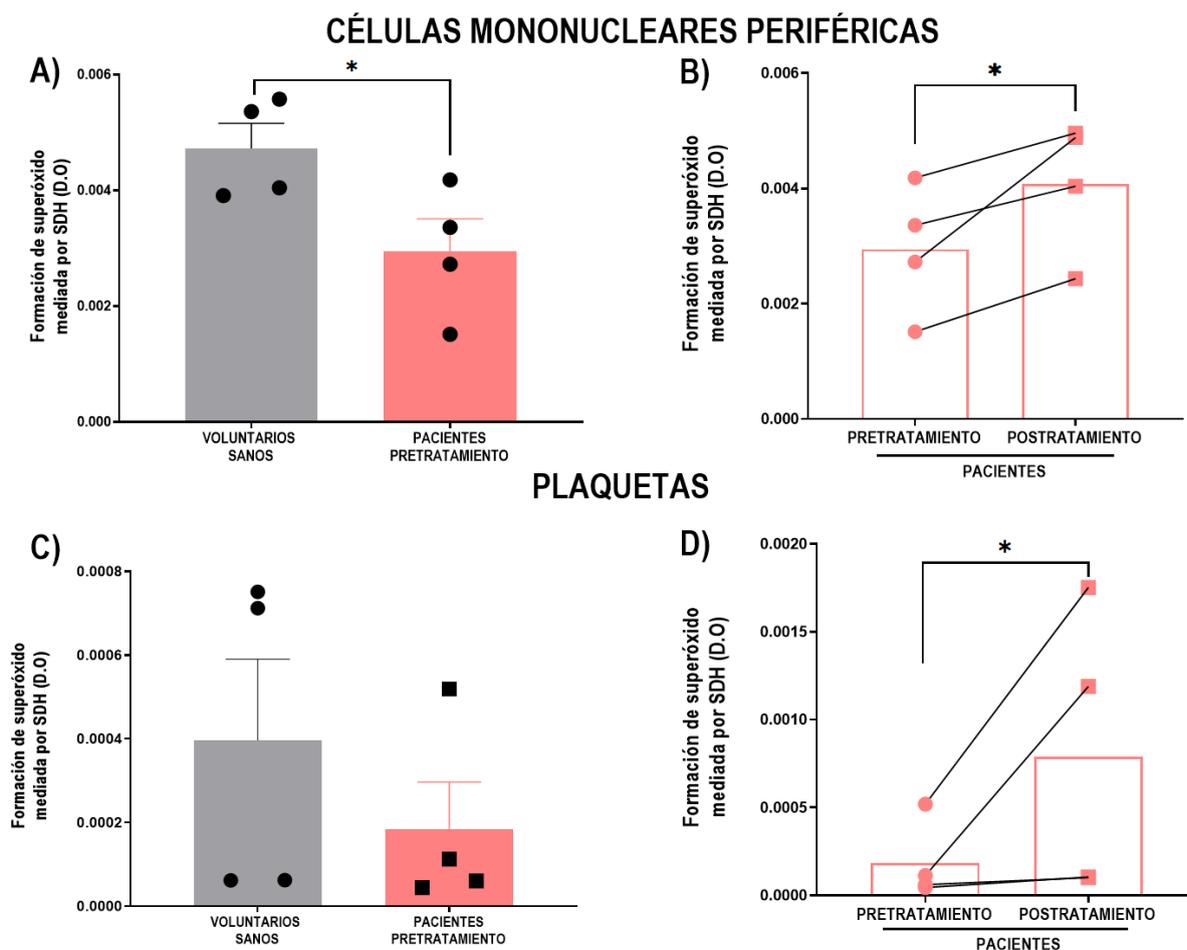


**Figura 15.** Formación basal de superóxido mediada por SDH, en células mononucleares periféricas y plaquetas. A) y B) Comparación de la formación basal de superóxido mediada por SDH entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en células mononucleares periféricas. C) y D) Comparación de la formación basal de superóxido mediada por SDH entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en plaquetas. Los resultados fueron expresados como

media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos paramétricos pre vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos paramétricos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado con  $\alpha$  0.05. \*p <0.05.

Asimismo, se determinó formación máxima de superóxido mediada por SDH en presencia de dUQ y azida sódica (inhibidor del complejo IV), en pacientes pre- y postratamiento; así como en voluntarios sanos, en células mononucleares periféricas y plaquetas. Las células mononucleares periféricas, mostraron una disminución significativa de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.003 \pm 0.00056$  D.O, voluntarios sanos:  $0.0047 \pm 0.00043$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 16A**). Tras el tratamiento, se observó que la formación había aumentado significativamente, en todos los pacientes en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $36.66\% \pm 10.55$ ;  $0.0041 \pm 0.00058$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 16B**).

En las plaquetas se observó un descenso de la formación de superóxido, sin diferencias estadísticamente significativas, en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.00018 \pm 0.00011$  D.O, voluntarios sanos:  $0.00039 \pm 0.00019$  D.O) (**Figura 16C**). Tras las 12 sesiones de tratamiento con FES, todos los pacientes mostraron un incremento significativo en la formación de superóxido en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $364.70\% \pm 125,25$ ;  $0.00079 \pm 0.0004$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 16D**).



**Figura 16. Formación máxima de superóxido mediada por SDH, dUQ y azida sódica, en células mononucleares periféricas y plaquetas.** A) y B) Comparación de la formación máxima de superóxido mediada por SDH, dUQ y azida sódica entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en células mononucleares periféricas. C y D) Comparación de la formación máxima de superóxido mediada por SDH, dUQ y azida sódica entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en plaquetas. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos paramétricos pre vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado y los no paramétricos mediante la prueba estadística Wilcoxon, ambas con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos paramétricos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado y los no paramétricos mediante la prueba estadística Mann-Whitney, ambos con  $\alpha$  0.05. \* $p$  < 0.05.

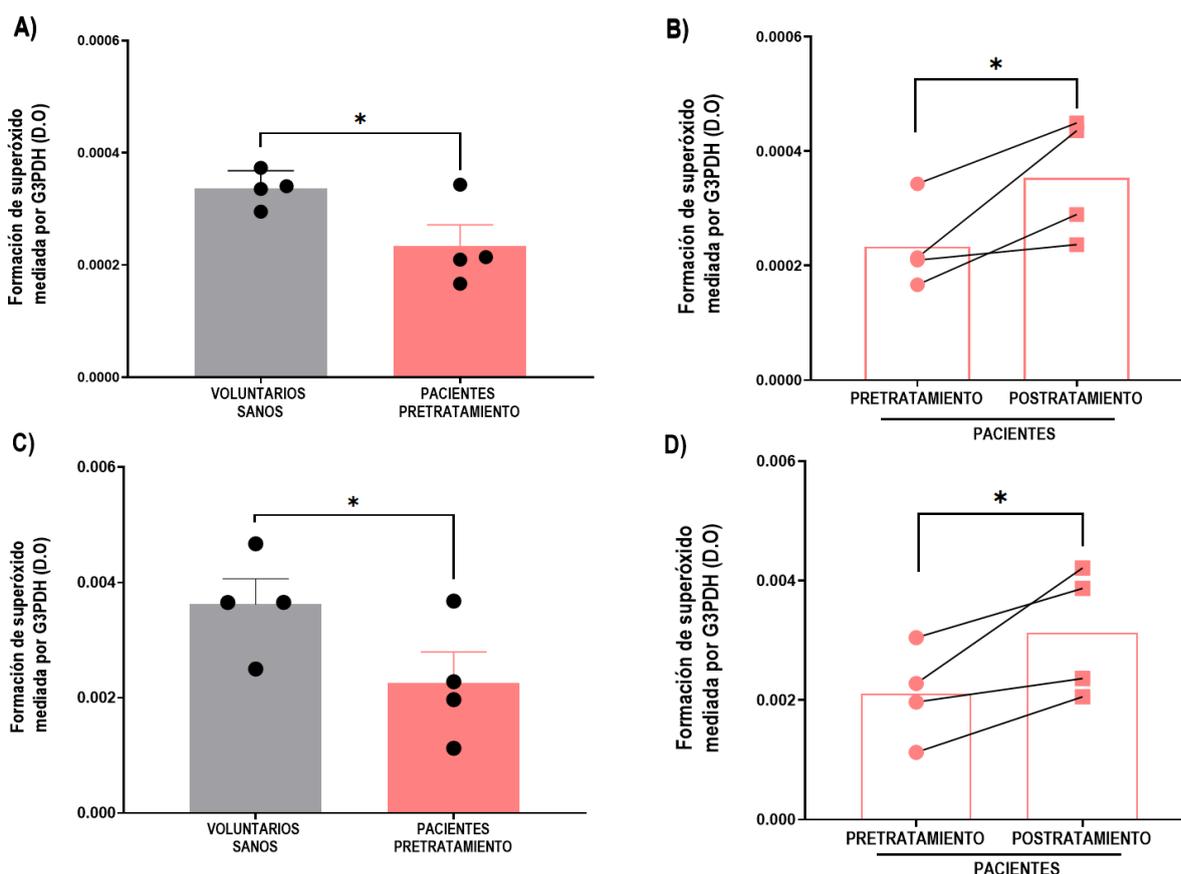
#### 4.2.3 Determinación de la formación de superóxido inducida por el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en sangre periférica

Para conocer el efecto de la FES sobre la lanzadera de electrones, se determinó la formación basal de superóxido mediada por G3PDH en pacientes pre- y postratamiento, así como en voluntarios sanos, en células mononucleares periféricas. Se pudo observar una disminución significativa en los pacientes pretratamiento frente a los voluntarios sanos (pretratamiento:

0.00023  $\pm$  0.000038 D.O, voluntarios sanos: 0.00033  $\pm$  0.000016 D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 17A**). Después del tratamiento con FES, los pacientes mostraron un incremento significativo en la formación de superóxido basal en comparación con el pretratamiento (postratamiento: 50.91%  $\pm$  12.91; 0.00035  $\pm$  0.000052 D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 17B**).

Además, se comparó la formación de superóxido máxima mediada por G3PDH en presencia de dUQ y azida sódica, tanto en pacientes pre- y postratamiento como en voluntarios sanos. Se encontró una disminución significativa de la formación máxima en los pacientes pretratamiento frente a los voluntarios sanos (pretratamiento: (0.0021  $\pm$  0.00039 D.O, voluntarios sanos: 0.0036  $\pm$  0.00044 D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 17C**). Posteriormente, cuando los pacientes recibieron el tratamiento con FES, se observó un incremento significativo en la formación de superóxido máxima con respecto al pretratamiento (postratamiento: 47.83%  $\pm$  12.37; 0.0031  $\pm$  0.0005 D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 17D**).

### CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS



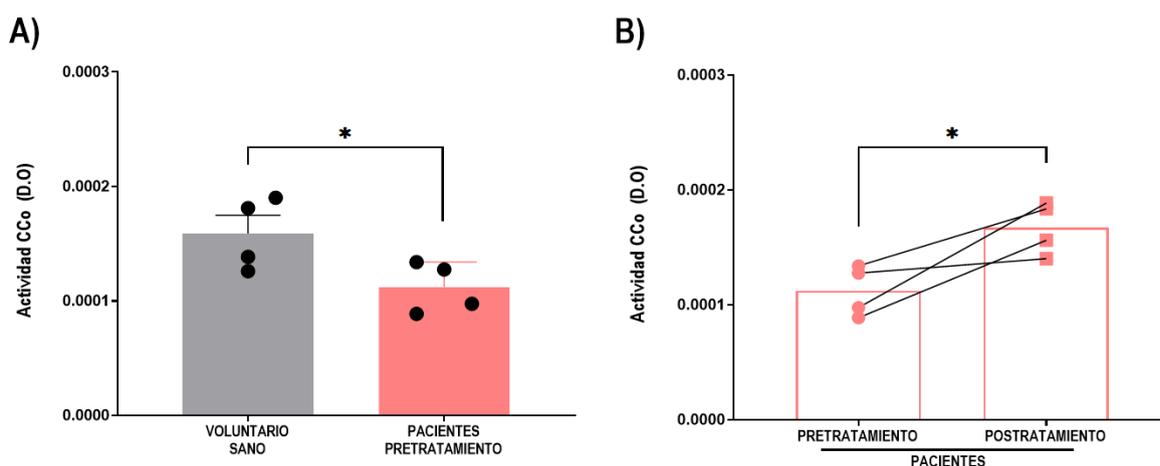
**Figura 17. Formación de superóxido mediada por G3PDH, en células mononucleares periféricas.** A) y B) Comparación de la formación basal de superóxido mediada por G3PDH entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento. C) y D) Comparación de la formación máxima de superóxido mediada por G3PDH, dUQ y azida sódica entre voluntarios sanos y

paciente pre- y postratamiento. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos paramétricos pre vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos paramétricos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado con  $\alpha$  0.05. \* $p$  <0.05.

#### 4.2.4 Determinación de la actividad citocromo c oxidasa en sangre periférica

Para valorar el efecto de la FES en el complejo IV mitocondrial, se determinó la actividad máxima de la CCo entre voluntarios sanos y pacientes pretratamiento y postratamiento. Los resultados mostraron una disminución significativa de la actividad CCo en pacientes con ACVs pretratamiento cuando eran comparados con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.0001 \pm 0.000011$  D.O, voluntarios sanos:  $0.00016 \pm 0.000015$  D.O;  $p$ <0.05) (**Figura 18 A**). El tratamiento con FES incrementó la actividad CCo con respecto a la actividad del pretratamiento (postratamiento:  $65.13\% \pm 23.77$ ;  $0.00016 \pm 0.000011$  D.O  $p$ <0.05). (**Figura 18 B**).

#### CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS

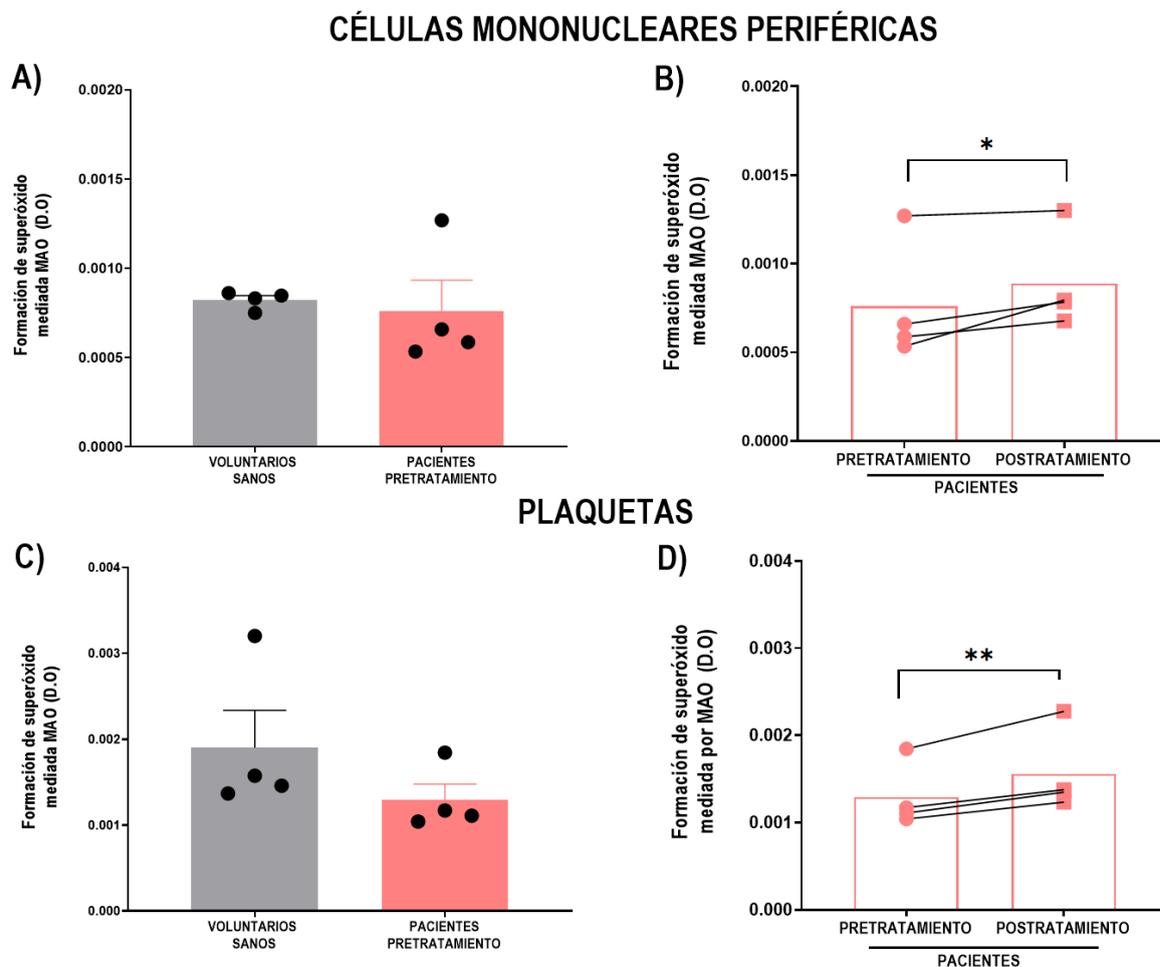


**Figura 18. Actividad de la CCo, en presencia de citocromo C exógeno, en células mononucleares periféricas.** A) Comparación de la actividad máxima de la CCo en presencia de citocromo C exógeno entre voluntarios sanos y paciente pretratamiento. B) Actividad máxima de la CCo en presencia de citocromo C exógeno en pacientes, pre- y postratamiento. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos pre vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado con  $\alpha$  0.05. \* $p$  <0.05.

#### **4.2.5 Determinación de la formación de superóxido inducida por MAO en sangre periférica**

Para conocer el efecto de la FES sobre la MAO, se determinó la formación basal de superóxido en pacientes pre- y postratamiento; así como en voluntarios sanos, en células mononucleares periféricas y plaquetas. En las células mononucleares periféricas se observó una disminución sin diferencias estadísticamente significativas de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.00077 \pm 0.000011$  D.O, voluntarios sanos:  $0.00089 \pm 0.000024$  D.O) (**Figura 19A**). Tras el tratamiento, se observó que la formación había aumentado significativamente, en todos los pacientes en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $11.68\% \pm 2.17$ ;  $0.00088 \pm 0.0001$ ;  $p < 0.05$ ) (**Figura 19B**).

En las plaquetas se observó el mismo comportamiento, un descenso sin diferencias estadísticamente significativas de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.0013 \pm 0.00018$  D.O, voluntarios sanos:  $0.0019 \pm 0.00043$  D.O) (**Figura 19C**). Tras las 12 sesiones de tratamiento con FES, todos los pacientes mostraron un incremento significativo en la formación de superóxido en comparación con el pretratamiento ( $15.38\% \pm 7.02$ ;  $0.0015 \pm 0.00024$  D.O;  $p < 0.01$ ) (**Figura 19D**).



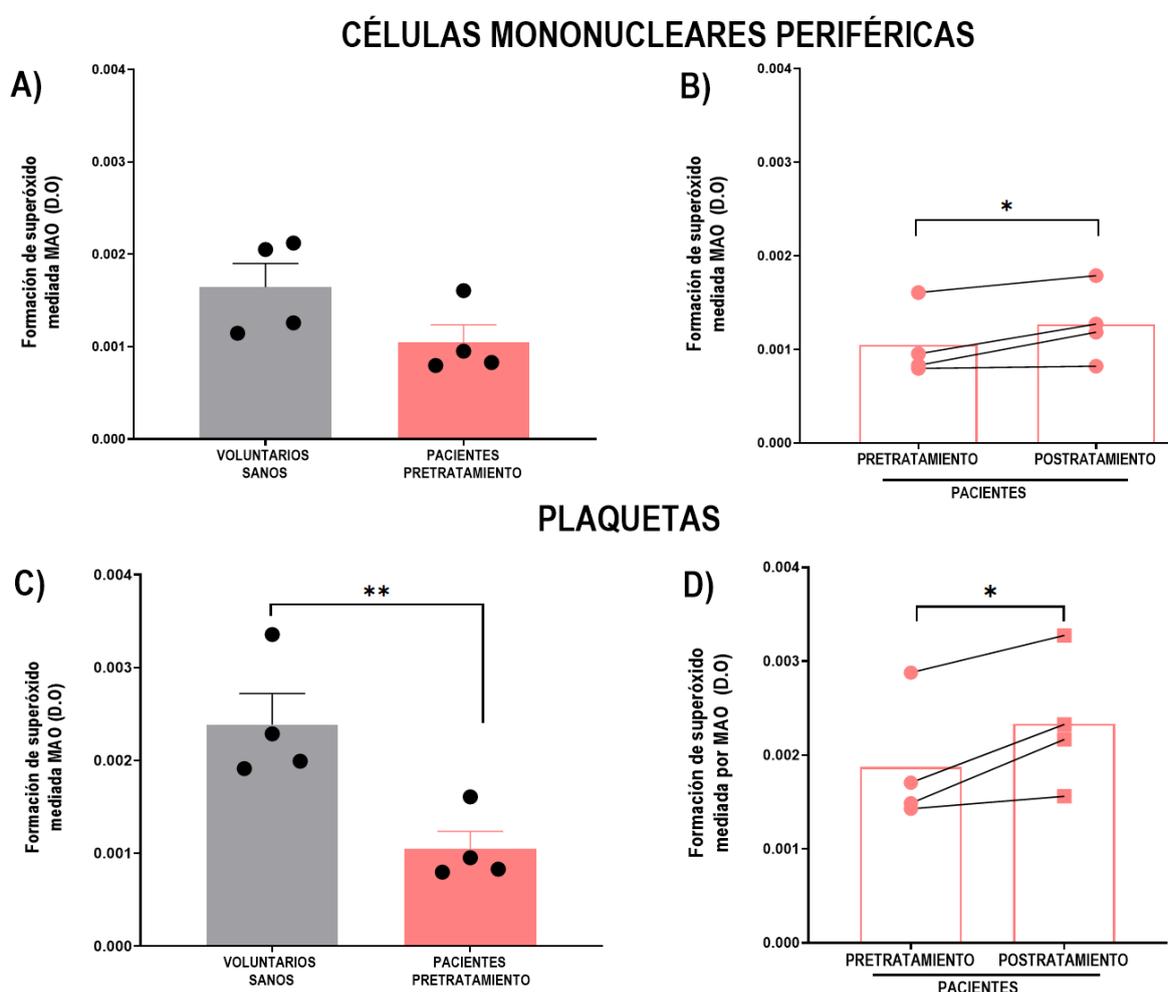
**Figura 19. Formación basal de superóxido mediada por la MAO, en células mononucleares periféricas y plaquetas.**

A) y B) Comparación de la formación basal de superóxido entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en células mononucleares periféricas. C y D) Comparación de la formación basal de superóxido entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en plaquetas. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos paramétricos pre vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student pareado y los no paramétricos mediante la prueba estadística Wilcoxon, ambas con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos paramétricos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado y para los no paramétricos la prueba estadística Mann-Whitney ambos con  $\alpha$  0.05. \* $p$  <0.05; \*\* $p$  <0.01.

Asimismo, se determinó formación máxima de superóxido mediada por la MAO en presencia de dUQ y azida sódica (inhibición del complejo IV), en pacientes pre- y postratamiento; así como en voluntarios sanos, en células mononucleares periféricas y plaquetas. Las células mononucleares periféricas, mostraron una disminución sin diferencias estadísticamente significativas de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.001 \pm 0.00012$  D.O, voluntarios sanos:  $0.0016 \pm 0.00025$  D.O) (**Figura 20A**). Tras el tratamiento, se observó que la formación había

aumentado significativamente, en todos los pacientes en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $22.68\% \pm 7.3$ ;  $0.0012 \pm 0.00019$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 20B**).

Las plaquetas mostraron una disminución significativa de la formación de superóxido en pacientes pretratamiento en comparación con los voluntarios sanos (pretratamiento:  $0.0018 \pm 0.00033$  D.O, voluntarios sanos:  $0.0024 \pm 0.00022$  D.O;  $p < 0.01$ ) (**Figura 20C**). Tras las 12 sesiones de tratamiento con FES, todos los pacientes mostraron un incremento significativo en la formación de superóxido en comparación con el pretratamiento (postratamiento:  $25.43\% \pm 7.97$ ;  $0.0023 \pm 0.00035$  D.O;  $p < 0.05$ ) (**Figura 20D**).

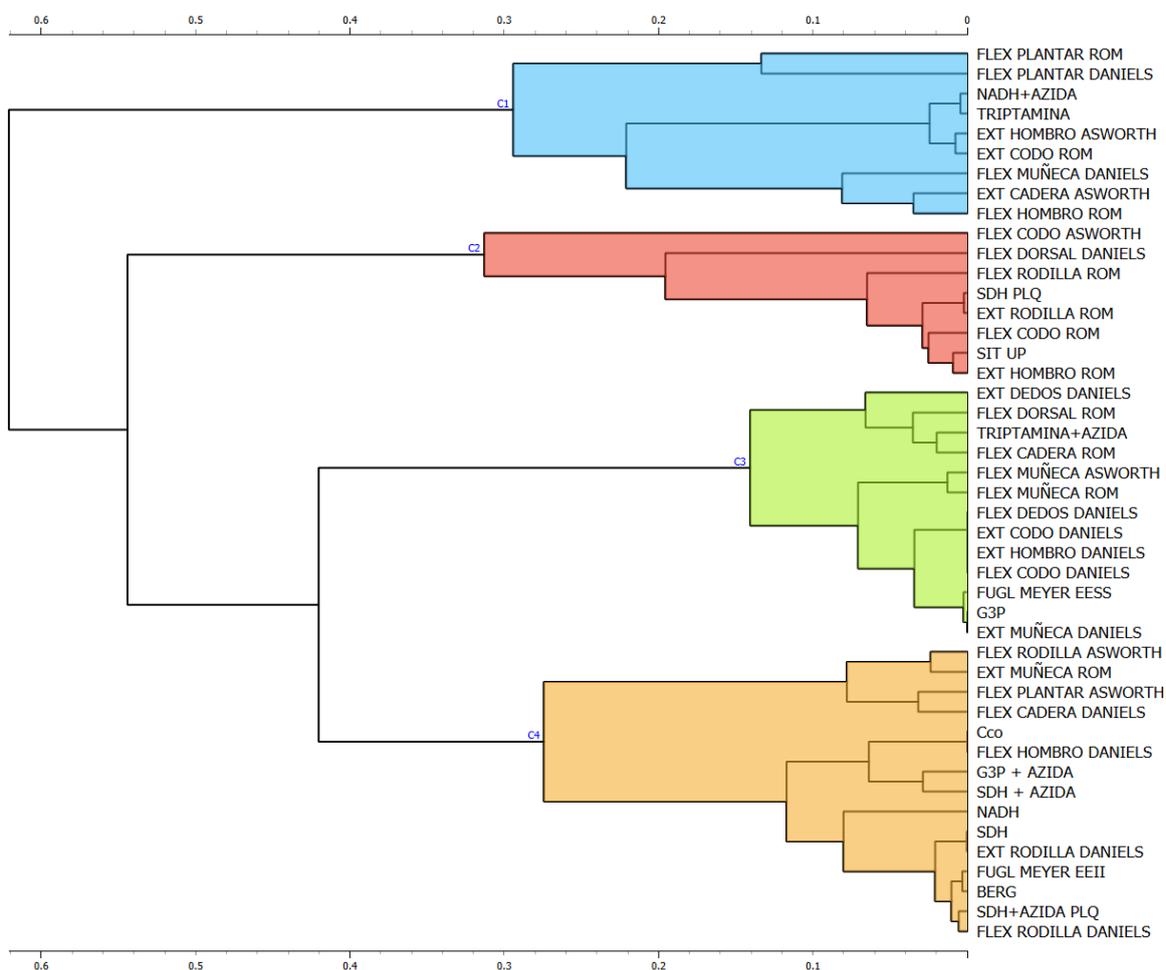


**Figura 20. Formación máxima de superóxido mediada por la MAO, en presencia de dUQ y azida sódica en células mononucleares periféricas y plaquetas.** A y B) Comparación de la formación máxima de superóxido con dUQ y azida sódica entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en células mononucleares periféricas. C y D) Comparación de la formación máxima de superóxido con dUQ y azida entre voluntarios sanos y paciente pre- y postratamiento, en plaquetas. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$ EEM y cada punto representa un valor independiente. Para comparar los datos paramétricos pre vs postratamiento, en pacientes, se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student

pareado con  $\alpha$  0.05. Para comparar los datos paramétricos de voluntarios sanos vs pacientes pretratamiento se llevó a cabo el análisis estadístico t-Student no pareado con  $\alpha$  0.05. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

### 4.3 ANÁLISIS CORRELACIONES ENTRE ACTIVIDADES MITOCONDRIALES Y VALORACIÓN FUNCIONAL Y MOTORA

Por último, se intentó determinar la posible relación entre las actividades mitocondriales y las valoraciones de la función motora. Para ello se detectó el cambio de las actividades mitocondriales tanto en células mononucleares periféricas como plaquetas (pretratamiento vs postratamiento) y posteriormente, se enfrentó al cambio en la valoración funcional (pretratamiento vs tratamiento); utilizándose la correlación de Pearson como distancia para agruparlas de manera jerárquica. Todas las variables de las agrupaciones o *cluster* presentan comportamientos similares (**Figura 21**).



**Figura 21. Agrupación jerárquica de las variables de la actividad mitocondrial y función motora, basada en la correlación de Pearson.** Cuando la actividad mitocondrial es realizada en plaquetas se indica como PLQ. CCo: citocromo C oxidasa; EEII: extremidad inferior; EESS: extremidad superior; Ext: extensión/extensores; Flex: Flexión/flexores; G3P:

gliceraldehído 3-fosfato; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido; PLQ: plaqueta; ROM: Rango de movimiento articular; SDH: Succinato deshidrogenasa.

A continuación, para garantizar que la correlación no era causal se consideró el p-valor de cada correlación y se tuvieron en cuenta solamente aquellas con un valor  $p < 0.05$  (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Correlaciones significativas establecidas mediante la correlación de Pearson ( $p < 0.05$ )**

VARIABLES FUNCIÓN MOTORA	VARIABLES ACTIVIDAD MITOCONDRIAL					
	SDH PBMCs	SDH PLQ	SDH + AZIDA PLQ	NADHDH + dUQ + AZIDA PBMCs	MAO PBMCs	MAO + dUQ + AZIDA PBMCs
EXTENSORES RODILLA (DANIELS)	0.99		0.95			
FLEXORES PLANTARES (DANIELS)	0.99		0.95			
EXTENSIÓN RODILLA (ROM)		0.99				
EXTENSIÓN HOMBRO (ROM)		0.99				
EXTENSIÓN CODO (ROM)				0.99	0.98	
BERG	0.97		0.99			
FLEXORES RODILLA (DANIELS)			0.98			
FLEXORES RODILLA (ASWORTH)				-0.96	-0,98	
FUGL-MEYER EEII	0.98		0.97			
EXTENSIÓN MUÑECA (ROM)						0.96
FLEXIÓN CADERA (ROM)						0.96
EXTENSORES DEDOS (DANIELS)						0.95
SIT TO STAND	0.95					

dUQ: decil ubiquinona; NADHDH: nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa; PBMCs: Células mononucleares periféricas; PLQ: plaqueta; ROM: Rango de movimiento articular; SDH: Succinato deshidrogenasa.

## 5. DISCUSIÓN

Los ACVs cursan con lesiones en las neuronas encargadas del control muscular (daño de 1ª motoneurona causada por la isquemia, secundaria a la lesión inicial, sea ésta isquémica o hemorrágica), lo que provoca trastornos motores secundarios (9). A nivel mitocondrial, esto se traduce en una disminución de los sistemas antioxidantes e incremento de ROS y estrés oxidativo (28), estableciéndose ello como uno de los mecanismos responsables del daño tisular en la fisiopatología del ACV (25) y relacionándose con las alteraciones producidas en la capacidad motora y funcional (18,41). La terapia basada en FES podría ayudar a restaurar la función mitocondrial mediante la reducción de ROS e incremento de la síntesis de ATP y biogénesis mitocondrial (42,43), que podría traducirse, a su vez, en un incremento de la función motora muscular (41). Por todo ello, el objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto de la FES en la función motora de pacientes que han sufrido ACVs; así como sobre la CTEM y la posible relación entre ambas, en muestras de sangre periférica.

Con este fin, primero, se estudió el efecto de la FES sobre la función motora mediante la valoración motora y funcional de cada paciente, antes y después del tratamiento, a través de diferentes escalas de fisioterapia. De esta manera, tras el tratamiento, los pacientes mostraron mejoras en la función motora y capacidad funcional, viéndose reflejado en una disminución de la espasticidad, aumento del equilibrio, rango articular, fuerza y resistencia. Además, como era de esperar, la musculatura estimulada de manera directa por los dispositivos y la adyacente, mejoraron significativamente, más en detalle: flexores dorsales, plantares, de cadera y de rodilla; así como el rango de movimiento articular: extensión de muñeca y flexión dorsal. En este sentido, diferentes estudios respaldan que la FES puede mejorar significativamente la función muscular de extremidad superior e inferior, así como la capacidad motora de pacientes con ACVs agudo y crónico (34,36,38–40). Es importante destacar la repercusión de estas mejoras en la capacidad funcional y calidad de vida de los pacientes con ACVs.

A continuación, para investigar el posible efecto de la FES sobre la CTEM y así poder establecer relaciones con la función del músculo esquelético, se utilizaron ensayos *in vitro* de la formación de superóxido como medida indirecta de la actividad de los complejos de la CTEM, de la lanzadera de electrones mitocondrial y de la MAO, mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible. Al tratarse de experimentos *in vitro*, el sistema antioxidante mitocondrial no presenta la capacidad de neutralizar el exceso de especies reactivas de

oxígeno que se producen al inducir la actividad del complejo; por tanto, el aumento en la formación de superóxido se relaciona con un incremento de la actividad de los complejos mitocondriales (59). En este sentido, un estudio demostró el poder antioxidante de la FES al aumentar la expresión del superóxido dismutasa y otros enzimas antioxidantes (60)

Para ello, se cuantificó la formación basal y máxima de superóxido de cada complejo de la CTEM (NADHDH, SDH, citocromo C oxidasa), de la lanzadera de electrones (G3PDH), y de la MAO mediante la inducción de su correspondiente sustrato en células mononucleares periféricas de pacientes, antes y después del tratamiento. Asimismo, se comparó con la formación de superóxido de voluntarios sanos. Investigar el efecto de la MAO, enzima que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y que interactúa con los complejos de la CTEM, permitió evaluar la presencia de alteraciones enzimáticas en la membrana externa mitocondrial y comprobar así que, los cambios generados por la FES se producen tanto a nivel de la membrana interna como externa mitocondrial (23). A su vez, se estudió la formación de superóxido basal y máxima en plaquetas, para establecer si los cambios producidos por el tratamiento se ocasionaban en la mitocondria de ambos tipos celulares. En las plaquetas, se realizó el análisis de la SDH, ya que es específica de la CTEM, y de la MAO; pudiendo englobar de esta forma, el estudio de la CTEM y de enzimas mitocondriales externas.

Respecto a las células mononucleares periféricas, la formación de superóxido basal se encontró estadísticamente reducida en todos los pacientes con ACVs pretratamiento cuando se comparó con los voluntarios sanos, en todos los complejos de la CTEM y en la lanzadera de transporte de electrones; exceptuando en la MAO. No obstante, tras someter a los pacientes a las 12 sesiones de FES, la formación de superóxido postratamiento se incrementó significativamente hasta los niveles de los voluntarios sanos. Como cabría esperar, al inducir la formación máxima de superóxido en presencia de dUQ e inhibiendo el citocromo C, con azida sódica, se produjo un aumento significativo de la formación de superóxido y se observó el mismo comportamiento descrito anteriormente. Inicialmente, antes del tratamiento, los pacientes mostraron una significativa reducción en la producción de superóxido respecto a los voluntarios sanos, exceptuando en la MAO, que posteriormente se incrementó significativamente tras las sesiones con FES. Asimismo, los resultados muestran que el tratamiento es capaz de restablecer la actividad mitocondrial de los complejos; así como de la lanzadera de electrones y de la MAO; es decir tanto a nivel interno como externo mitocondrial.

Lo que podría traducirse en mejoras de la función metabólica, aumento en la síntesis de ATP y, en consecuencia, reducción del estrés oxidativo (61,62).

En cuanto a las plaquetas, tanto la formación basal como máxima de superóxido se encontraba reducida en pacientes con ACVs pretratamiento respecto a los voluntarios sanos, con cambios significativos en el caso de la formación máxima de la MAO. Tras el tratamiento con FES, se produjo un incremento significativo de la formación de superóxido en los pacientes, mediada por ambas enzimas (SDH y MAO). Estos resultados indican que los cambios generados por el tratamiento mejoran la actividad de la CTEM, de la enzima MAO y que, también, se producen en la membrana externa e interna de la mitocondria y en este tipo celular.

Por un lado, que la MAO en células mononucleares periféricas y la SDH en plaquetas no muestren diferencias estadísticamente significativas entre voluntarios sanos y pacientes pretratamiento, pero sí un incremento significativo de la actividad mitocondrial entre pacientes pre- y postratamiento, podría señalar una mayor capacidad de predecir la eficacia del tratamiento con FES frente a la capacidad de discriminar entre voluntarios sanos y pacientes con ACVs.

Por otro lado, se pudieron establecer correlaciones significativas entre las variables de la función motora y las variables de la actividad mitocondrial para los complejos I, II (en este caso, tanto en células mononucleares periféricas como en plaquetas), y para la MAO. De forma que, en tanto que la actividad mitocondrial de los pacientes mejoraba tras el tratamiento, la función motora también lo hacía. Esto pone en manifiesto una mayor capacidad del complejo I y de la MAO, en células mononucleares periféricas, así como del complejo II en ambos tipos celulares para prever la eficacia del tratamiento con FES sobre la función motora. Lo que puede respaldar la relación existente entre la CTEM y la capacidad funcional del músculo esquelético y explicar la contribución del estrés oxidativo en la disfunción muscular (60,61,63).

Las líneas generales de los resultados obtenidos, en ambos tipos celulares, ponen en manifiesto la reducción de la actividad mitocondrial de los pacientes pretratamiento con ACV respecto a los voluntarios sanos. En este sentido, diferentes estudios realizados tanto en cerebro de jerbo, humano y en sangre periférica demostraron que la actividad de los complejos de la CTEM se encontraba significativamente reducidos tras la instauración de un ACV isquémico o hemorrágico (60,64,65). Esto, puede relacionarse con el rol del estrés oxidativo en el mecanismo fisiopatológico del ACV (25). Además, la FES restaura de manera significativa la

actividad de la CTEM. Los cambios son intrínsecos para la mitocondria, ya que pueden observarse tanto a nivel interno como externo y en ambos tipos celulares. Esto podría promover la síntesis de ATP, disminución de ROS e incremento de los sistemas antioxidante y conducir a mejoras en la producción de energía y capacidad funcional y motora del músculo esquelético (62,66,67). Teniendo en cuenta la importante respuesta clínica, se puede plantear monitorizar la capacidad funcional de los pacientes con ACVs a través de la capacidad energética, así como el uso de la actividad mitocondrial como posible biomarcador en la fisiopatología de los ACVs y/o en la eficacia del tratamiento con FES.

Por todo ello, a pesar de que el estudio presente sus propias limitaciones debido al bajo tamaño muestral, en consecuencia, la dificultad de establecer conclusiones robustas, y la ausencia de un grupo de voluntarios sanos a los que se les administre el tratamiento con FES, no se puede ignorar el efecto de la FES sobre la función motora y la actividad mitocondrial de pacientes con ACVs, así como la correlación existente entre ambas. Por ello, estos resultados podrían conducir al uso de la metodología aquí descrita para ahondar en el conocimiento de los mecanismos biomoleculares subyacentes a las secuelas motoras de los ACVs y promover así, una transferencia para la mejora de su tratamiento.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Este trabajo demuestra, a través de ensayos bioquímicos, que la actividad mitocondrial en pacientes con ACVs está disminuida con respecto a la actividad de voluntarios sanos.
2. Los resultados indican que la intervención durante 12 sesiones con FES no solo mejora la función motora de los pacientes, sino que corrige alteraciones bioquímicas que se producen en actividad mitocondrial de pacientes con ACVs.
3. En pacientes con ACVs se ha detectado una correlación positiva entre los efectos que produce la FES sobre las medidas funcionales y las bioquímicas relacionadas con el metabolismo energético celular.
4. La medida de actividad mitocondrial podría ser utilizada como un biomarcador para el diagnóstico de la patología y el pronóstico de la respuesta al tratamiento, si bien es necesario un estudio más amplio que corrobore estos resultados preliminares.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cuadrado ML, Arias JA, Palomar MA, Linares R. The pyramidal tract: New pathways. *Rev Neurol* [Internet]. 2001 [consulta, 15/10/2022];32(12):1151-8. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11562847/>
- (2) Welniarz Q, Dusart I, Roze E. The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2017 [consulta, 1/04/2023];77(7):810-29. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27706924/>
- (3) Fromm C, Evarts E V. Pyramidal tract neurons in somatosensory cortex: central and peripheral inputs during voluntary movement. *Brain Res.* [Internet] 1982 [consulta, 15/10/2022];238(1):186-91. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6805854/>
- (4) Adrian ED, Moruzzi G. Impulses in the pyramidal tract. *J Physiol* [Internet]. 1939 [consulta, 15/10/2022];97(2):153. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1393899/>
- (5) Patton HD, Towe AL, Kennedy TT. Activation of pyramidal tract neurons by ipsilateral cutaneous stimuli. *J Neurophysiol* [Internet]. 1962 [consulta, 15/10/2023];25:501-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14484429/>
- (6) Navarro V, Jiménez S, del Valle M. Vía piramidal o corticoespinal [Internet]. España; 2021 [consulta, 15/10/22]. Disponible en: <https://sindesi.es/via-piramidal-o-corticoespinal/>
- (7). Escobar JR, Leal AG, Quereda CC, Armas CE, Trillo EM, Yu RG, et al. Síndromes motores. *Medicine* [Internet]. 2023 [consulta, 15/10/2022];13(75):4415-27. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/576177>
- (8) Castro JG, Leal AG, Bravo AM, Quereda CC, Armas CE, López JG, et al. Síndromes topográficos del cerebro, cerebelo y troncoencéfalo. *Medicine* [Internet]. 2023 [consulta, 15/10/2023];13(75):4437-51. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8870774>

- (9) Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares [Internet]. [consulta, 2/11/2022]. Disponible en: <https://espanol.ninds.nih.gov/es/trastornos/accidentes-cerebrovasculares>
- (10) Berru Loayza KF. Factores pronósticos de morbilidad y secuelas del accidente cerebrovascular en adultos mayores. Universidad Católica de Cuenca [Internet]. 2021 [consulta, 2/11/2022]. Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/11419>
- (11) Soto Á, Guillén-Grima F, Morales G, Muñoz S, Aguinaga-Ontoso I, Fuentes-Aspe R, et al. Prevalencia e incidencia de ictus en Europa: revisión sistemática y metaanálisis. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2022 [consulta, 2/11/2023];45(1):979. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272022000100012](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272022000100012)
- (12) Informe Anual del Sistema Nacional de Salud 2020-2021 [Internet]. [7/11/2022]. Disponible en: [https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2020\\_21/INFORME\\_ANUAL\\_2020\\_21.pdf](https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2020_21/INFORME_ANUAL_2020_21.pdf)
- (13) Chaves Sell F. Accidente vascular cerebral: ¿es el accidente vascular cerebral una enfermedad tratable?. Rev. costarric. cardiol [Internet]. 2000 [consulta, 7/11/2022];2(1):27-33. Disponible en: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-41422000000100005](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422000000100005)
- (14) Fernanda Ruiz-Mejía A, Enrique Pérez-Romero G, Alberto Ángel-Macías M. Ataque cerebrovascular isquémico: fisiopatología desde el sistema biomédico y su equivalente en la medicina tradicional china Stroke: pathophysiology from the biomedical system perspective and its equivalent in the traditional Chinese medicine. Rev Fac Med. [Internet]. 2017 [consulta, 7/11/2022];65(1):137-81. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v65n1/0120-0011-rfmun-65-01-00137.pdf>
- (15) Jameson J, McGraw H, editores. Principios de Medicina Interna [Internet]. España: Harrison; 2019 [consulta, 16/11/2023]. Disponible en:

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2461&sectionid=197384474>

- (16) Pérez Arellano JL autor. Manual de patología general. 7 ma ed. Elsevier Massos; 2010 Disponible en: [https://encore.uib.es/iii/encore/record/C\\_Rb2109630?lang=cat](https://encore.uib.es/iii/encore/record/C_Rb2109630?lang=cat)
- (17) Tornero DE, Seña V, Jordán J. La mitocondria como diana farmacológica en los procesos neurodegenerativos. Offarm [Internet]. 2002 [consulta, 16/11/2022];21(11):98-102. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/266742173\\_La\\_mitocondria\\_como\\_diana\\_farmacologica\\_en\\_los\\_procesos\\_neurodegenerativos](https://www.researchgate.net/publication/266742173_La_mitocondria_como_diana_farmacologica_en_los_procesos_neurodegenerativos)
- (18) Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. Redox Biol [Internet]. 2020 [consulta, 16/11/2022];37: 101674. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32811789/>
- (19) Lenaz G, Genova ML. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2010 [consulta, 16/11/2022];12(8):961-1008. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19739941/>
- (20) Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu Z Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). Int J Mol Med [Internet]. 2019 [consulta, 16/11/2022];44(1):3-15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31115493/>
- (21) Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. FASEB Journal [Internet]. 2015 [consulta, 16/11/2022];29(12):4766-71. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253366/>
- (22) García-Fernández M. Desarrollo de técnicas farmacológicas para la identificación y cribado de fármacos mediante microarrays de membranas celulares . [España]: Universidad del País Vasco; 2015.
- (23) Graves SM, Xie Z, Stout KA, Zampese E, Burbulla LF, Shih JC, et al. Dopamine metabolism by a monoamine oxidase mitochondrial shuttle activates the electron

- transport chain. *Nat Neurosci* [Internet]. 2020 [consulta, 16/11/2022];23(1):15-20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31844313/>
- (24) Yang B, Chen Y, Shi J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem Rev* [Internet]. 2019 [consulta, 16/11/2022];119(8):4881-985. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30973011/>
- (25) Jurcau A. Insights into the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases: Focus on Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [consulta, 16/11/2022];22(21):11847. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34769277/>
- (26) Collier JJ, Oláhová M, McWilliams TG, Taylor RW. Mitochondrial signalling and homeostasis: from cell biology to neurological disease. *Trends Neurosci* [Internet]. 2023 [consulta, 16/11/2022];46(2):137-52. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0166223622002399/fulltext>
- (27) He Z, Ning N, Zhou Q, Khoshnam SE, Farzaneh M. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020 [consulta, 16/11/2022];146:45-58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31704373/>
- (28) Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2000 [consulta, 20/11/2022];29(3-4):222-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11035250/>
- (29) Rich PR, Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem* [Internet]. 2010 [consulta, 20/11/2022];47:1-23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20533897/>
- (30) Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol* [Internet]. 2007 [consulta, 20/11/2022];6(2):149-61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239802/>
- (31) Donnelly C, Stegmüller J, Blazeovich AJ, Crettaz Von Roten F, Kayser B, Neyroud D, et al. Modulation of torque evoked by wide-pulse, high-frequency neuromuscular electrical stimulation and the potential implications for rehabilitation and training. *Scientific Reports* [Internet]. 123d. C. [citado 1 de abril de 2023];11:6399. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-85645-0>

- (32) Sheffler LR, Chae J. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation. *Muscle Nerve* [Internet]. 2007 [consulta, 20/11/2022];35(5):562-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17299744/>
- (33) Nakipoğlu Yuzer GF, Köse Dönmez B, Özgirgin N. A Randomized Controlled Study: Effectiveness of Functional Electrical Stimulation on Wrist and Finger Flexor Spasticity in Hemiplegia. *J Stroke Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2017 [consulta, 20/11/2022];26(7):1467-71. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28462794/>
- (34) Sánchez-González P, Marín A, Rodríguez M, Oropesa I, Gómez EJ. Comparison of electrode positions for a multi-field FES device for compensation of foot drop. XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica CASEIB 2020: Libro de actas, 2020, ISBN 978-84-09-25491-0, págs 201-205 [Internet]. 2020 [citado 1 de abril de 2023];201-5. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8202823&info=resumen&idioma=ENG>
- (35) Imatz-Ojanguren E, Sánchez-Márquez G, Asiain-Aristu JR, Cueto-Mendo J, Jaunarena-Goicoechea E, Zabaleta H, et al. A foot drop compensation device based on surface multi-field functional electrical stimulation-Usability study in a clinical environment. *J Rehabil Assist Technol Eng* [Internet]. 2019 [consulta, 20/11/2022];6:205566831986214. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31516730/>
- (36) Martín-Odrizola A, Rodríguez-de-Pablo C, Caceres-Salegi A, García-Calleja A, Marín-Ojea JI, Hernández E, et al. Analysis of the movements generated by a multi-field functional electrical stimulation device for upper extremity rehabilitation. *Artif Organs* [Internet]. 2022 [consulta 21/11/2022];46(10):2027-33. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aor.14346>
- (37) Odrizola-Martín A. Estimulación eléctrica funcional para la rehabilitación de la motricidad de la extremidad superior post-accidente cerebro vascular: revisión sistemática y profundización en la aplicabilidad de la tecnología FES multi-campo. [España]: Universidad del País Vasco; 2019.

- (38) Martínez-Tejedor A, Álvarez-García A, Martín-Odriozola A, Ortigueira-García S. Uso combinado de estimulación eléctrica funcional y entrenamiento mediante perturbaciones para el tratamiento del equilibrio en una persona con accidente cerebrovascular: un estudio de caso. *Fisioterapia* [Internet]. 2023 [consulta, 21/11/2022]. Disponible en : <https://www.elsevier.es/es-revista-fisioterapia-146-avance-resumen-uso-combinado-estimulacion-electrica-funcional-S0211563823000068>
- (39) Sabut SK, Sikdar C, Kumar R, Mahadevappa M. Improvement of gait & muscle strength with functional electrical stimulation in sub-acute & chronic stroke patients. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* [Internet]. 2011 [consulta, 21/11/2022];2011:2085-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22254748/>
- (40) Sabut SK, Lenka PK, Kumar R, Mahadevappa M. Effect of functional electrical stimulation on the effort and walking speed, surface electromyography activity, and metabolic responses in stroke subjects. *J Electromyogr Kinesiol* [Internet]. 2010 [consulta, 28/12/2022];20(6):1170-7. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20692180/n>
- (41) Gondin J, Brocca L, Bellinzona E, D'Antona G, Maffiuletti NA, Miotti D, et al. Neuromuscular electrical stimulation training induces atypical adaptations of the human skeletal muscle phenotype: A functional and proteomic analysis. *J Appl Physiol* [Internet]. 2011 [consulta, 28/12/2022];110(2):433-50. Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.00914.2010>
- (42) Handschin C, Mortezaei A, Plock J, Eberli D. External physical and biochemical stimulation to enhance skeletal muscle bioengineering. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2015 [consulta 12/1/2023];82-83:168-75. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25453267/>
- (43) Shiragaki-Ogitani M, Kono K, Nara F, Aoyagi A. Neuromuscular stimulation ameliorates ischemia-induced walking impairment in the rat claudication model. *J Physiol Sci* [Internet]. 2019 [consulta, 12/1/2023];69(6):885-93. Disponible en: <https://jps.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12576-019-00701-9>

- (44) Dong HL, Wu HY, Tian ZX, Luo Z, Wu YF, Zhao J. Electrical stimulation induces mitochondrial autophagy via activating oxidative stress and Sirt3 signaling pathway. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2021 [consulta, 12/1/2022];134(5):628. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7929685/>
- (45) Cecatto RB, Oltes, Maximino JR, Chadi G. Motor recovery and cortical plasticity after functional electrical stimulation in a rat model of focal stroke. *Am J Phys Med Rehabil* [Internet]. 2014 [consulta, 28/1/2023];93(9):791-800. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24800715/>
- (46) Rodenburg RJT, Schoonderwoerd GC, Tiranti V, Taylor RW, Rötig A, Valente L, et al. A multi-center comparison of diagnostic methods for the biochemical evaluation of suspected mitochondrial disorders. *Mitochondrion* [Internet]. 2013 [consulta, 28/1/2023];13(1):36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23164799/>
- (47) The post-stroke hemiplegic patient. 1. a method for evaluation of physical performance - PubMed [Internet]. 1975 [citado 1 de abril de 2023] ;7(1):13-31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1135616/>
- (48) Mutlu A, Livanelioglu A, Gunel MK. Reliability of Ashworth and Modified Ashworth Scales in Children with Spastic Cerebral Palsy. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2008 [consulta, 3/2/2023];9:44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18402701/>
- (49) Suchomel TJ, Nimphius S, Bellon CR, Stone MH. The Importance of Muscular Strength: Training Considerations. *Sports Medicine* [Internet]. 2018 [consulta, 3/2/2023];48(4):765-85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29372481/>
- (50) ESCALA BERG: valoración del equilibrio en pacientes con DCA [Internet]. [consulta, 28/2/2023]. Disponible en: <https://irenea.es/blog-dano-cerebral/escala-berg-valoracion-del-equilibrio-en-pacientes-con-dca/>
- (51) Norkin CC, White DJoyce. Goniometría evaluación de la movilidad articular. 2 nd ed. F.A. Davis Company; 2006.
- (52) 30 Seconds Sit To Stand Test - Physiopedia [Internet]. [consulta, 28/2/2023]. Disponible en: [https://www.physio-pedia.com/30\\_Seconds\\_Sit\\_To\\_Stand\\_Test](https://www.physio-pedia.com/30_Seconds_Sit_To_Stand_Test)

- (53) MM B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 [consulta, 4/3/2023];72(1-2):248-54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>
- (54) Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ, Agarwal A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl* [Internet]. 2003 [consulta, 10/3/2023];24(6):862-70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14581512/>
- (55) Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* [Internet]. 2005 [consulta, 10/3/2023];11(SUPPL.):127-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16216776/>
- (56) Vanle BC, Florang VR, Murry DJ, Aguirre AL, Doorn JA. Inactivation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase by the Dopamine Metabolite, 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde. *Eupb* [Internet]. 2017 [consulta, 10/3/2023];492(2):275-281. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28830811/>
- (57) Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J Cell Biol* [Internet]. 1968 [consulta, 10/3/2023];38(1):1-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4300067/>
- (58) Shannon WA, Wasserkrug HL, Seligman AM. THE ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF MONOAMINE OXIDASE (MAO) WITH TRYPTAMINE AND A NEW TETRAZOLIUM SALT, 2-(2'-BENZOTHIAZOLYL)-5-STYRYL-3-(4'-PHTHALHYDRAZIDYL TETRAZOLIUM CHLORIDE (BSPT)'. *JHC* [Internet]. 1974 [consulta, 1/4/2023];3(2):170-182. Disponible en : <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/22.3.170>
- (59) Barreda-Gómez G, Astigarraga E. Method for screening compounds that modulate the activity of electron transport chain. Spain; WO/2019/053137, 2019.

- (60) Elsner V, Trevizol L, De Leon I, Da Silva M, Weiss T, Braga M, et al. Therapeutic effectiveness of a single exercise session combined with WalkAide functional electrical stimulation in post-stroke patients: a crossover design study. *Neural Regen Res* [Internet]. 2021 [consulta, 1/4/2023];16(5):805. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33229713/>
- (61) Tsai NW, Chang YT, Huang CR, Lin YJ, Lin WC, Cheng BC, et al. Association between oxidative stress and outcome in different subtypes of acute ischemic stroke. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [consulta, 1/4/2023];2014. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24895559/>
- (62) Gariballa SE, Hutchin TP, Sinclair AJ. Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *QJM* [Internet]. 2002 [consulta, 1/4/2023];95(10):685-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12324641/>
- (63) Spranger M, Krempien S, Schwab S, Donneberg S, Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. Correlation with clinical course and infarct size. *Stroke* [Internet]. 1997 [consulta, 1/4/2023];28(12):2425-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9412626/>
- (64) Kim-Han JS, Kopp SA, Dugan LL, Diringner MN. Perihematomal Mitochondrial Dysfunction After Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* [Internet]. 2006 [consulta, 24/4/2023];37(10):2457-62. Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.STR.0000240674.99945.4e>
- (65) Allen KL, Almeida A, Bates TE, Clark JB. Changes of Respiratory Chain Activity in Mitochondrial and Synaptosomal Fractions Isolated from the Gerbil Brain After Graded Ischaemia. *J Neurochem* [Internet]. 1995 [consulta, 24/4/2023];64(5):2222-9. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1471-4159.1995.64052222.x>
- (66) Pires Dorneles G, Reichert Vital da Silva I, Korb A, Bertoldi K, Rodrigues Siqueira I, Rostirola Elsner V, et al. High intensity interval exercise enhances the global HDAC activity in PBMC and anti-inflammatory cytokines of overweight. *Obesity Medicine* [Internet]. 2016 [consulta, 1/4/2023];2:25-30 Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2451847616300033?via%3Dihub>

- (67) Fessler E, Chibane F, Wang Z, Chuang DM. Potential roles of HDAC inhibitors in mitigating ischemia-induced brain damage and facilitating endogenous regeneration and recovery. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013 [consulta, 1/4/2023];19(28):5105-5115. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23448466/>