

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**“ESTUDIO DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN  
RESPUESTA A UN ESQUEMA DE REHABILITACIÓN  
INTEGRAL EN PACIENTES POST-ICTUS ISQUÉMICO”**

**PRESENTADA POR  
M.C.P SANTIAGO EMILIO ROJAS GUTIÉRREZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**JUNIO 2026**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ESTUDIO DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN RESPUESTA A UN  
ESQUEMA DE REHABILITACIÓN INTEGRAL EN PACIENTES POST-ICTUS  
ISQUÉMICO”**

**Por**

**M.C.P SANTIAGO EMILIO ROJAS GUTIÉRREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**JUNIO, 2026.**

**“ESTUDIO DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN RESPUESTA  
A UN ESQUEMA DE REHABILITACIÓN INTEGRAL EN PACIENTES  
POST-ICTUS ISQUÉMICO”**

**Aprobación de la tesis:**



---

**Dr. C. Noé Macías Segura**  
**Director de la Tesis**



---

**Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona**  
**Co-director de Tesis**



---

**Dr. Med. Carlos Eduardo Medina de la Garza**  
**Comisión de Tesis**



---

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## DEDICATORIA

Para mi esposa Gloria Edith, quien me ayudó a encontrar el camino que debía seguir, y acompañarme en cada paso del mismo.

*“Bien sabemos que el odio contra la ruindad deforma el rostro y la rabia contra la injusticia enronquece la voz. ¡Ah!, nosotros, que queríamos preparar el terreno para la bondad no pudimos ser bondadosos. Pero vosotros, cuando llegue el momento en que el hombre sea bueno para el hombre, acordaos de nosotros con comprensión.”*

-Bertold Brecht,

“A los que vendrán después”

1986

## AGRADECIMIENTOS

**A mi familia:** a mis padres, Mario y Carolina, por haberme dado un hogar cálido y con amor, siempre creer en mí y darme la oportunidad de llegar tan lejos; a mis hermanos, Mario y Ana que siempre fueron un modelo a seguir y con quienes siempre pude contar; a mis primos, Alejandro, Miguel y Daniel, que además de ser mi familia se convirtieron en mis mejores amigos; y a Gloria, mi esposa, por aceptar convertirse en parte de esta familia, darme un futuro a su lado y ser el motor que me permite seguir adelante.

**A mis compañeros y amigos:** Oliver, quien me acompañó en los altos y bajos de esta odisea; Luisa, que siempre fue un oído, la voz de la razón y una gran amiga, y Edgar un gran amigo, que me ayudó a creer más en mí; Ustedes me apoyaron no solo en el ámbito académico, sino y más importante, en el personal.

**A mis amigos,** Oscar, a quien he visto crecer y mejorar cada día desde hace más de 12 años, Yussif, que se ha vuelto tan cercano y parte de la familia, a César, por inspirarme a seguir en este camino, Amairani, por ayudarme a seguir en él y Mariana, porque creía en mí, incluso cuando yo no lo hacía.

**A mis compañeros y amigos de maestría y doctorado,** con quienes compartí momentos inolvidables en los últimos dos años, cuyos nombres no puedo colocar, puesto que abarcaría toda la página, que sepan que esto lo escribo con todos ellos en mente.

**A mi asesor,** el Dr. Noé por ser un gran mentor, creer en mí para tomar este camino, y apoyarme en cada paso de él.

**A los profesores del departamento de inmunología,** quienes siempre estuvieron dispuestos a escuchar cada duda y convirtieron el departamento en un segundo hogar.

**A los estudiantes** del laboratorio de Inmunología de sistemas, Aaron, Brittany y Karina, de quienes aprendí al tratar de enseñar:

**Gracias.**

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO II   INTRODUCCIÓN	2
2.1 Ictus isquémico, definición y epidemiología	2
2.1.1 Definición de ictus.	2
2.1.2 Epidemiología del ictus.	2
2.2 Etiología y fisiopatología del ictus.	3
2.2.1 Mecanismos etiológicos del ictus isquémico.	3
2.2.2 Mecanismos fisiopatológicos de daño al parénquima cerebral.	4
2.3 La respuesta inflamatoria aguda en el ictus isquémico.	5
2.3.1 Activación de las células residentes de tejido en el cerebro.	5
2.3.2 Polarización de la microglía en el ictus isquémico agudo	6
2.3.3 Permeabilización de la barrera hematoencefálica y migración de células del sistema inmune periférico.	7
2.4. Respuesta inflamatoria subaguda y crónica en ictus isquémico.	8
2.4.1 Activación de linfocitos en ganglios linfáticos y migración hacia el cerebro	9
2.5 Neuroplasticidad e inmunomodulación post-ictus	10
2.5.1 Neuroplasticidad post-ictus.	10
2.5.2 El efecto de la inmunomodulación sobre la neuroplasticidad	10
2.5.3 Rehabilitación y neuroplasticidad.	11
2.6 Biomarcadores: definición, clasificación y aplicabilidad clínica.	12
2.7 Biomarcadores en ictus isquémico	13
2.7.1 Biomarcadores inflamatorios en ictus isquémico	13
2.7.2 Factores de crecimiento como biomarcadores	14
2.7.3 MicroARNs como biomarcadores emergentes en ictus	14
2.8 Integración de biomarcadores y escalas clínicas en la respuesta a rehabilitación	15
2.9 Herramientas bioinformáticas, metaanálisis de expresión génica y análisis <i>in silico</i> en la identificación de biomarcadores	15
2.10 ANTECEDENTES	17

CAPÍTULO III   JUSTIFICACIÓN	20
CAPÍTULO IV   HIPÓTESIS	21
4.1 Hipótesis nula	21
4.2 Hipótesis alterna	21
CAPÍTULO V   OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL:	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	22
CAPÍTULO VI   MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Diseño del estudio	23
6.2 Estrategia de búsqueda y fuentes de información del análisis <i>in silico</i> .	23
6.3 Criterios de selección de estudios transcriptómicos	23
6.3.1 Criterios de inclusión	23
6.3.2 Criterios de exclusión:	24
6.3.3 Selección de series y extracción de datos	24
6.4 Análisis <i>in silico</i> de perfiles transcripcionales de sujetos post-ictus	25
6.4.1 Análisis de expresión diferencial	25
6.4.2 Análisis de sobrerrepresentación y enriquecimiento de vías	26
6.4.3 Variables de interés del objetivo <i>in silico</i>	26
6.5 Evaluación longitudinal de biomarcadores proinflamatorios en una cohorte post-ictus isquémico durante un esquema de rehabilitación integral	26
6.5.1 Diseño del estudio	27
6.5.2 Población de estudio	27
6.5.3 Programa de rehabilitación integral y seguimiento clínico	27
6.5.4 Tiempos de evaluación y obtención de muestras biológicas	28
6.5.5 Determinación de concentraciones plasmáticas de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento	28
6.5.6 Determinación de la expresión relativa de microARNs en plasma.	29
6.5.7 Síntesis de cDNA y cuantificación de microARNs mediante ensayos TaqMan.	30
CAPÍTULO VII   RESULTADOS	32

7.1 Análisis <i>in sillico</i> de potenciales biomarcadores de éxito terapéutico de un esquema de rehabilitación integral en pacientes post ictus isquémico.	32
7.1.1 Identificación y selección de series transcriptómicas	32
7.1.2 Procesamiento de datos y análisis de expresión diferencial	33
7.1.3 Visualización global de la expresión diferencial y enriquecimiento funcional.	40
7.1.4 Análisis de enriquecimiento de vías inmunológicas mediante GSVa	41
7.1.5 Valoración de la expresión de microARNs en perfiles transcripcionales de suero y plasma.	43
7.1.6 Predicción de genes blanco de microARNs relevantes	45
7.2 Evaluación longitudinal de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en una cohorte de sujetos post-ictus durante un esquema de rehabilitación integral.	46
7.2.1 Características clínicas de la cohorte	47
7.2.2 Evolución clínica de los pacientes post-ictus durante un esquema de rehabilitación integral	47
7.2.3 Índice de respuesta global de los pacientes post-ictus durante la rehabilitación integral	48
7.2.4 Determinación de la concentración de citocinas antes del inicio de la terapia integral, al mes de su inicio y 3 meses posteriores.	50
7.2.5 Alteraciones del perfil de citocinas antes y durante la rehabilitación integral en comparación con controles.	52
7.2.6 Análisis longitudinal de citocinas en pacientes post-ictus sometidos a rehabilitación integral:	56
7.3 Determinación de la expresión relativa de microRNAs durante un esquema de rehabilitación integral	57
7.3.1 Estabilidad de microARNs	57
7.3.2 Expresión relativa de microARNs circulantes durante la rehabilitación	58
7.4 Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante la rehabilitación integral	59
7.4.1 Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el primer mes de rehabilitación integral	60
7.4.2 Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el tercer mes de rehabilitación integral	63

CAPÍTULO VIII   DISCUSIÓN	66
CAPÍTULO IX   CONCLUSIÓN	84
CAPÍTULO X   PERSPECTIVAS	85
BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráficos de volcán y enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados en ictus isquémico agudo y subagudo.	41
Figura 2. Mapa de calor de puntuación de GSVA de vías inflamatorias en ictus isquémico agudo, subagudo y controles sanos.	42
Figura 3. Distribución de puntuaciones de GSVA de vías de interés en el tiempo subagudo.	43
Figura 4. Gráficos de volcán de datasets transcriptómicos en suero y plasma.	44
Figura 5. Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados en los distintos datasets de suero y plasma	45
Figura 6. Genes regulados por hsa-miR-206 predichos por el algoritmo miRWalk.	46
Figura 7. Puntajes en escalas Rankin, NIHSS, Barthel y Lovett de los 9 pacientes a lo largo de las 3 evaluaciones	49
Figura 8. Índice de respuesta global de los 9 pacientes	50
Figura 9. Mapa de calor citocinas durante un esquema de rehabilitación integral.	51
Figura 10. Comportamiento longitudinal de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento durante la rehabilitación integral post-ictus isquémico.	56
Figura 11. Estabilidad y correlación de los microARNs endógenos utilizados para la normalización de la expresión relativa.	58
Figura 12. Expresión relativa de microARNs durante un esquema de rehabilitación integral.	59
Figura 13. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el primer mes de rehabilitación integral.	60
Figura 14. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos a los 3 meses de rehabilitación integral.	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bases de datos transcriptómicas de perfiles de expresión de sujetos con ictus isquémico identificadas en NCBI-GEO.	32
Tabla 2. Top 50 genes diferencialmente expresados ictus isquémico agudo y controles sanos.	34
Tabla 3. Top 50 genes diferencialmente expresados ictus isquémico subagudo y controles sanos.	36
Tabla 4. Top 50 genes diferencialmente expresados ictus isquémico agudo e ictus isquémico subagudo.	38
Tabla 5. Características clínicas y funcionales basales de la cohorte de pacientes post-ictus isquémico y controles sanos	48
Tabla 6. Comparación basal de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento entre pacientes post-ictus isquémico y controles sanos.	52
Tabla 7. Comparación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento al mes de rehabilitación entre pacientes post-ictus isquémico y controles pareados.	53
Tabla 9. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el primer mes de rehabilitación integral.	62
Tabla 10. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos a los 3 meses de rehabilitación integral.	65

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**GBD** – *Global Burden of Disease* / Carga mundial de enfermedad.

**DALY** – *Disability-Adjusted Life Years* / Años de vida ajustados por discapacidad.

**TOAST** – *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* / Clasificación etiológica del ictus isquémico.

**ATP** – Adenosín trifosfato.

**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>** – Sodio/Potasio.

**NMDA** – *N-methyl-D-aspartate* / N-metil-D-aspartato.

**AMPA** – *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*.

**Ca<sup>2+</sup>** – Calcio.

**ROS** – *Reactive Oxygen Species* / Especies reactivas de oxígeno.

**DAMPs** – *Damage-Associated Molecular Patterns* / Patrones moleculares asociados a daño.

**NF-κB** – *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* / Factor nuclear kappa B.

**HIF-1** – *Hypoxia-Inducible Factor 1* / Factor inducible por hipoxia 1.

**STAT3** – *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* / Transductor de señal y activador de la transcripción 3.

**M1** – Fenotipo microglial/macrofágico proinflamatorio.

**BHE** – Barrera hematoencefálica.

**MMP** – Metaloproteinasa de matriz.

**MMP-9** – Metaloproteinasa de matriz 9.

**MDM** – *Monocyte-Derived Macrophage* / Macrófago derivado de monocito.

**VLA-4** – *Very Late Antigen-4* / Antígeno muy tardío 4.

**VCAM-1** – *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* / Molécula de adhesión celular vascular 1.

**LFA-1** – *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1* / Antígeno asociado a función linfocitaria 1.

**ICAM-1** – *Intercellular Adhesion Molecule-1* / Molécula de adhesión intercelular 1.

**CXCL10** – *C-X-C Motif Chemokine Ligand 10* / Ligando 10 de quimiocina C-X-C.

**CXCR3** – *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3* / Receptor 3 de quimiocina C-X-C.

**CCL5** – *C-C Motif Chemokine Ligand 5* / Ligando 5 de quimiocina C-C.

**CCR5** – *C-C Motif Chemokine Receptor 5* / Receptor 5 de quimiocina C-C.

**Th1** – Linfocitos T cooperadores tipo 1.

**Th17** – Linfocitos T cooperadores tipo 17.

**CD8<sup>+</sup>** – Linfocitos T citotóxicos CD8 positivos.

**Treg** – Linfocitos T reguladores.

**IL** – Interleucina.

**TNF** – *Tumor Necrosis Factor* / Factor de necrosis tumoral.

**C1q** – Componente C1q del sistema del complemento.

**C3** – Componente C3 del sistema del complemento.

**AVERT** – *A Very Early Rehabilitation Trial*.

**CPASS** – *Critical Periods After Stroke Study*.

**NIH** – *National Institutes of Health*.

**FDA** – *Food and Drug Administration*.

**MCP-1/CCL2** – *Monocyte Chemoattractant Protein-1 / C-C Motif Chemokine Ligand 2* / Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

**RANTES/CCL5** – *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted / C-C Motif Chemokine Ligand 5*.

**IP-10/CXCL10** – *Interferon gamma-induced Protein 10 / C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*.

**BDNF** – *Brain-Derived Neurotrophic Factor* / Factor neurotrófico derivado del cerebro.

**IGF-1** – *Insulin-like Growth Factor 1* / Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1.

**VEGF** – *Vascular Endothelial Growth Factor* / Factor de crecimiento endotelial vascular.

**miARN** – MicroARN.

**RNA** – Ácido ribonucleico.

**GEO** – *Gene Expression Omnibus*.

**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*.

**PBMC** – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* / Células mononucleares de sangre periférica.

**GEO2R** – Herramienta de análisis diferencial de expresión de GEO.

**DEG** – *Differentially Expressed Gene* / Gen diferencialmente expresado.

**GO** – *Gene Ontology*.

**KEGG** – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

**GSEA** – *Gene Set Enrichment Analysis*.

**GSVA** – *Gene Set Variation Analysis*.

**RT-qPCR** – *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* / PCR cuantitativa con retrotranscripción.

**NIHSS** – *National Institutes of Health Stroke Scale* / Escala de ictus de los Institutos Nacionales de Salud.

**mRS** – *Modified Rankin Scale* / Escala modificada de Rankin.

**MFI** – *Median Fluorescence Intensity* / Intensidad mediana de fluorescencia.

**cDNA** – DNA complementario.

**$\Delta$ Ct** – Delta Ct.

**$\Delta\Delta$ Ct** – Delta delta Ct.

**Ct** – *Cycle threshold* / Ciclo umbral.

**DESeq2** – Paquete estadístico para análisis de expresión diferencial en RNA-seq.

**$\log_2$ FC** –  *$\log_2$  Fold Change* / Cambio de expresión en escala  $\log_2$ .

**p adj.** – Valor de p ajustado.

**RNA-seq** – Secuenciación de RNA.

## CAPÍTULO I | RESUMEN

**Introducción:** El ictus isquémico representa una de las principales causas de muerte y discapacidad adquirida en el adulto a nivel mundial. A pesar de los avances en el manejo agudo, la mayoría de los pacientes presenta secuelas motoras, cognitivas y funcionales que requieren rehabilitación para su recuperación. La recuperación post-ictus depende de múltiples mecanismos en los cuales participa el sistema inmune. Actualmente no existe un esquema de rehabilitación estandarizado, principalmente por la falta de biomarcadores que permitan predecir o monitorizar la respuesta funcional a un esquema de rehabilitación.

**Metodología:** Se realizó un estudio en dos fases. Primero, se desarrolló un análisis *in silico* de perfiles transcriptómicos públicos de pacientes con ictus isquémico disponibles en Gene Expression Omnibus, con el objetivo de identificar genes diferencialmente expresados y vías moleculares relacionadas con inflamación, señalización por citocinas, quimiocinas y respuesta inmune sistémica en ictus isquémico. Posteriormente, se llevó a cabo una evaluación longitudinal en pacientes con ictus isquémico reciente sometidos a un esquema de rehabilitación integral. Se obtuvieron muestras de plasma antes del inicio de la rehabilitación, al mes y a los tres meses posteriores. En estas muestras se cuantificaron citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento mediante Luminex, y se evaluó la expresión relativa de microARNs circulantes mediante RT-qPCR con ensayos TaqMan. La recuperación funcional se valoró mediante las escalas de: NIHSS, escala modificada de Rankin, índice de Barthel y escala de Lovett.

**Resultados:** El análisis transcriptómico permitió identificar enriquecimiento de vías inmunológicas relacionadas con inflamación, activación leucocitaria, señalización por citocinas, quimiocinas. En la fase clínica, la cuantificación longitudinal de biomarcadores plasmáticos permitió encontrar asociaciones entre mejoría clínica y el cambio en las citocinas, se encontró un aumento de citocinas proinflamatorias durante el primer mes de rehabilitación. La expresión relativa de miR206 se asoció con una mejoría en la escala de Lovett, al igual que múltiples citocinas, posiblemente asociadas a la mejoría en la movilidad y fuerza muscular de los pacientes.

**Conclusión:** Se identificó una serie de biomarcadores que correlacionaron de manera significativa con mejoría en escalas clínicas. La integración de biomarcadores circulantes con escalas clínicas puede contribuir a una mejor caracterización de la respuesta a la rehabilitación integral y a la identificación de perfiles moleculares asociados con recuperación funcional.

## CAPÍTULO II | INTRODUCCIÓN

### 2.1 Ictus isquémico, definición y epidemiología

Una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo es el ictus, del latín, “choque”, mejor conocido por su anglicismo “stroke”.

#### 2.1.1 Definición de ictus.

El ictus es un episodio súbito de interrupción del flujo sanguíneo al cerebro y es una de las principales causas de muerte y de discapacidad adquirida en el adulto y a pesar de los avances en el manejo agudo, un porcentaje considerable de los sobrevivientes presentan secuelas, que pueden afectar capacidades motoras, cognitivas y funcionales que condicionan su calidad de vida y su futura reintegración social (1–3).

#### 2.1.2 Epidemiología del ictus.

El ictus representa un problema de salud pública, en el 2021 fue catalogada por el estudio “Global Disease Burden” (GBD) como la tercera causa mundial de muerte y la cuarta causa de discapacidad adquirida, con cerca de 93.8 millones de personas viviendo con las secuelas de un ictus y 11.9 millones de casos nuevos en ese año, lo que se traduce en una carga creciente de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs), donde el ictus es responsable de 160.2 millones de DALYs a nivel mundial (2). De estas estadísticas, el ictus isquémico es el subtipo que representa la mayor carga, ya que es la etiología más común y representa aproximadamente dos terceras partes de los eventos de ictus totales (62 a 67%), por lo que concentra gran parte del impacto en supervivencia y secuelas funcionales (4).

En México, se estima una incidencia de ictus isquémico de 58.6 por 100,000 habitantes en 2019, siendo una de las principales enfermedades que contribuyen a mortalidad y discapacidad a nivel nacional (5).

## **2.2 Etiología y fisiopatología del ictus.**

La recuperación tras un ictus depende en gran medida de la naturaleza y la magnitud de la lesión isquémica que lo originó. Por lo tanto, antes de abordar los procesos que afectan la rehabilitación es necesario caracterizar las causas que provocan la interrupción del flujo cerebral y entender cómo éstas determinan la topografía y la severidad del daño. Un ictus isquémico ocurre cuando el suministro de oxígeno y nutrientes a una región cerebral disminuye, ya sea por una obstrucción física sobre una placa aterosclerótica, al arrastre de un embolo desde el corazón o vasos proximales, o a una perfusión sistémica insuficiente que afecta zonas vulnerables del cerebro (6).

### **2.2.1 Mecanismos etiológicos del ictus isquémico.**

Según su etiología, el ictus isquémico puede caracterizarse por la oclusión de una arteria cerebral que resulta en la disminución o cese del flujo sanguíneo causando isquemia y muerte del tejido, con el subsecuente déficit neurológico por tres mecanismos fisiopatológicos principales:

La formación de un trombo sobre una placa aterosclerótica o sobre un endotelio dañado, frecuentemente en arterias cervicales o intracraneales de gran calibre (7). Este mecanismo suele asociarse a un territorio isquémico bien delimitado y a factores de riesgo vasculares (hipertensión, dislipidemia, tabaquismo) (8); Embolismo: material tromboembólico, habitualmente de origen cardiaco (fibrilación auricular, trombos intracavitarios) o de placas ulceradas a distancia, es llevado por el torrente sanguíneo hasta ocluir una rama cerebral (9). Los eventos cardioembólicos tienden a producir infartos de mayor tamaño y con evolución clínica brusca (10); Oclusión de pequeños vasos (enfermedad lacunar):

arteriopatía arteriolar por hipertensión crónica u otros procesos que generan microinfartos en núcleos profundos y sustancia blanca; e Hipoperfusión sistémica: disminución global del flujo cerebral (por ejemplo, en shock o insuficiencia cardíaca) que afecta zonas límite y puede producir lesiones multifocales (11). Clínicamente, estas causas se integran en la clasificación TOAST por sus siglas en inglés "Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment" (aterosclerosis de grandes arterias, cardioembolismo, oclusión de pequeños vasos, otras causas e indeterminado), que orienta pronóstico y manejo. Cada mecanismo determina la distribución, tamaño e intensidad de la lesión inicial y condiciona las vías secundarias de lesión (p. ej. excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación) que influyen en la recuperación. (6,11).

### **2.2.2 Mecanismos fisiopatológicos de daño al parénquima cerebral.**

En el parénquima cerebral, después de que ocurre la disminución del flujo sanguíneo tras la oclusión arterial, la falta de oxígeno conduce a una disminución de ATP, el cual es necesario para el funcionamiento de bombas iónicas necesarias para el funcionamiento celular, como la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , lo que induce despolarización sostenida, edema citotóxico y liberación masiva de glutamato, al no poder sostener su gradiente osmótico, las células sufren una necrosis isquémica, este es un proceso que afecta a todas las poblaciones celulares en el parénquima, incluyendo las neuronas, la glía y el endotelio (6).

Otros mecanismos de muerte celular en un ictus son la excitotoxicidad mediada por receptores NMDA y AMPA y sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que activa proteasas, lipasas y endonucleasas, disminuye la función mitocondrial y amplifica el daño por estrés oxidativo o especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica. A la vez, la liberación de algunos de estos componentes, así como del contenido intracelular conlleva a una respuesta inflamatoria, la cual, si bien es necesaria, ocasiona una extensión de la lesión si esta respuesta inflamatoria no es regulada adecuadamente (6,12).

Actualmente se sabe que, en el núcleo isquémico, el cual es la región directamente irrigada por la arteria que perdió el flujo sanguíneo, predomina muerte celular rápida por necrosis, mientras que, en la zona de penumbra, término que hace referencia al tejido circundante al núcleo isquémico que tiene una disminución en el flujo sanguíneo y que es potencialmente rescatable si se reestablece el flujo, la muerte celular ocurre por los mecanismos secundarios como lo es la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la inflamación y apoptosis (6,13).

### **2.3 La respuesta inflamatoria aguda en el ictus isquémico.**

La inflamación participa en todas las fases del ictus, desde el establecimiento de la lesión y la extensión de la lesión secundaria, hasta el proceso de recuperación y durante la rehabilitación post-ictus. La respuesta inmune y sus mediadores tienen efectos pleiotrópicos sobre el estado clínico de un paciente, por lo que el rol que la respuesta inflamatoria es dinámico durante la fase post-ictus (14–16).

#### **2.3.1 Activación de las células residentes de tejido en el cerebro.**

La respuesta inflamatoria comienza con la activación y migración de la microglía hacia el sitio de la lesión, donde se activan en respuesta a los DAMPs liberados por el tejido necrótico y se activan vías con efectores río abajo como NF- $\kappa$ B, HIF-1, STAT3, entre otros (16). A su vez, la respuesta inflamatoria promueve la eliminación de los detritos celulares, (DAMPs) que promueven la inflamación local (6), a través de la fagocitosis, lo que facilita la transición hacia un fenotipo inmunológico de resolución (12,17).

### **2.3.2 Polarización de la microglía en el ictus isquémico agudo**

Poco después se polariza la microglía, donde el fenotipo que adquiere la microglía en respuesta a estos efectores es un fenotipo M1 o proinflamatorio, donde su principal función es llevar a cabo la limitación de la extensión del daño y promover la fagocitosis de células muertas en el tejido (16), que es la eliminación de células necróticas y apoptóticas presentes en la lesión, lo que reduce la liberación de señales proinflamatorias y favorece un microambiente resolutivo, por lo que, en este contexto, la inflamación limita el daño secundario y prepara el parénquima para reparación tisular y recuperación funcional, un proceso que es regulado por múltiples citocinas, quimiocinas, y otras moléculas de señalización celular (18).

Sin embargo, la microglía de tipo M1 también puede tener un efecto deletéreo o neurotóxico sobre las neuronas en la región de penumbra, principalmente a través de la liberación de citocinas citotóxicas, ROS, proteasas, y recientemente se ha observado que podría estar mediado por transfección de mitocondrias entre microglía y neuronas, influyendo así sobre la supervivencia de las mismas (14,19).

Por lo que, la inflamación puede extender la lesión, pero es necesaria, ya que disminuir la respuesta inflamatoria en la fase aguda tiene efectos deletéreos por los mecanismos previamente descritos y se ha descrito en observaciones realizadas en modelos experimentales,(20–22) y en ensayos clínicos (23–25), que la eliminación de la microglía, o la disminución de la respuesta inflamatoria a través de glucocorticoides u otros inmunomoduladores (Natalizumab, Enlimomab, anti-integrina  $\alpha$ 4 y anti-ICAM-1, respectivamente) administrados en la fase aguda favorecen un peor desenlace.

### **2.3.3 Permeabilización de la barrera hematoencefálica y migración de células del sistema inmune periférico.**

Otro componente de la respuesta inflamatoria en el parénquima cerebral es el efecto que tiene sobre la barrera hematoencefálica (BHE), la cual en respuesta a citocinas y DAMPs se permeabiliza y permite extravasación de proteínas plasmáticas, aumento de edema y facilita la entrada de células inmunes al parénquima que usualmente se trata de una zona inmuno privilegiada (26).

Este es un proceso dinámico y se ha podido utilizar clínicamente como un marcador de un peor pronóstico clínico (6,26). Molecularmente, ocurre por la degradación de la lámina basal y uniones estrechas mediada por metaloproteinasas de matriz (MMP), especialmente de la MMP-9, que es producida por neutrófilos y macrófagos y a nivel sistémico se ha detectado su elevación en el ictus isquémico y se asocia a riesgo de transformación hemorrágica (27).

La BHE permeable facilita la infiltración de neutrófilos y monocitos, mismos que promueven la producción y liberación de citocinas, ROS y proteasas que agravan la disfunción vascular, promueven el fenotipo M1 y la muerte celular secundaria en la penumbra, procesos que nos hablan del porque la inflamación en el ictus debe ser un proceso autolimitado, al igual que en cualquier otro tejido que haya sufrido un insulto o lesión (26).

Es por todos estos procesos que la respuesta inflamatoria en la fase aguda es un fenómeno pleiotrópico necesario para delimitar el daño al parénquima cerebral y preparar el tejido para el cambio hacia una respuesta de reparación; cuya activación excesiva se puede considerar un marcador de mal pronóstico, pero principalmente por su relación con el tamaño y la extensión de la lesión (14).

## **2.4. Respuesta inflamatoria subaguda y crónica en ictus isquémico.**

La fase subaguda de la respuesta inflamatoria post-ictus se caracteriza por la activación linfocitaria, donde los macrófagos infiltrantes de tejido y la microglía producen citocinas que promueven la activación de linfocitos T y estas son la población que mantiene la inflamación durante la fase subaguda (28,29). En esta etapa persisten señales inflamatorias locales, quimiocinas, alteración de la barrera hematoencefálica y exposición de antígenos cerebrales, lo que favorece la infiltración y activación de linfocitos T en el tejido lesionado (29). La literatura experimental y humana sugiere que las células T pueden detectarse tempranamente, pero su acumulación y activación pueden mantenerse durante semanas e incluso meses, lo cual coincide temporalmente con el periodo en el que la rehabilitación busca inducir reorganización funcional, recuperación motora y remodelación de circuitos neuronales (29,30).

En la actualidad se reconoce que existe una fase de resolución activa, mediada por una familia de lípidos bioactivos denominados mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs, del inglés specialized pro-resolving mediators), que incluyen las lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas (31). Estos mediadores, derivados enzimáticamente de ácidos grasos poliinsaturados limitan la infiltración leucocitaria y promueven activamente la eferocitosis, la polarización microglial hacia fenotipos resolutivos (32). En ictus isquémico, la capacidad del microambiente en la fase subaguda para activar estas vías pro-resolutivas determina si la respuesta inflamatoria es regulada y adaptativa (favoreciendo la neurorreparación) o si deriva en una inflamación crónica maladaptativa que perpetúa el daño secundario (33). Este concepto de 'inflammatory toning' es utilizado para describir la presencia de ciertos mediadores inflamatorios en la fase subaguda tardía, la cual no es necesariamente deletérea, sino que puede reflejar una respuesta biológica activa orientada a la recuperación funcional.

### **2.4.1 Activación de linfocitos en ganglios linfáticos y migración hacia el cerebro**

Durante la fase subaguda, los antígenos derivados del tejido cerebral isquémico pueden salir del sistema nervioso central por rutas perivasculares, meníngeas, linfáticas meníngeas o a través del líquido cefalorraquídeo, alcanzando ganglios linfáticos cervicales donde pueden ser procesados por células presentadoras de antígeno (34,35). En estos órganos linfoides, las células dendríticas y macrófagos pueden presentar antígenos neuronales o derivados de mielina a linfocitos T naive o de memoria, promoviendo su activación, diferenciación y adquisición de fenotipos efectores o reguladores (30,36). Además, se ha descrito señalización cerebro-ganglio cervical posterior al ictus, lo que apoya la existencia de una comunicación inmunológica bidireccional entre el cerebro lesionado y el sistema inmune periférico (35).

Una vez activados, los linfocitos pueden expresar receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión que facilitan su migración hacia el cerebro a través de la barrera hematoencefálica alterada, el plexo coroideo o las meninges; entre los mecanismos descritos se incluyen interacciones VLA-4/VCAM-1, LFA-1/ICAM-1 y ejes quimiocina-receptor como CXCL10/CXCR3 o CCL5/CCR5 (30).

En la recuperación post-ictus, el fenotipo de los linfocitos que alcanzan el tejido lesionado puede influir en la recuperación. Respuestas de tipo Th1, Th17 o CD8+ citotóxicos podrían perpetuar inflamación y daño secundario, mientras que Treg o subpoblaciones productoras de IL-10 podrían favorecer resolución inflamatoria, recuperación de la integridad de la BHE y polarización de la glía y microglía hacia fenotipos resolutivos, un microambiente más permisivo para plasticidad (30).

## **2.5 Neuroplasticidad e inmunomodulación post-ictus**

Se ha hablado sobre la participación del sistema inmune en el establecimiento y resolución de la lesión generada por el ictus, sin embargo, el sistema inmune también participa en la recuperación de la función perdida por el ictus, afectando la neuroplasticidad.

### **2.5.1 Neuroplasticidad post-ictus.**

La capacidad del cerebro de reorganizarse y recuperar una función perdida en un déficit neurológico se conoce como neuroplasticidad, es una cualidad inherente del cerebro, que se lleva a cabo por mecanismos como brote axonal, plasticidad sináptica y neurogénesis y es el principal mecanismo que es promovido por la rehabilitación, para la atención y recuperación de las secuelas post-ictus (37).

En el ictus, es necesario que, a través de la neuroplasticidad, se generen nuevas conexiones entre las regiones corticales afectadas y una reorganización del mapa de representación cortical (38). Estos cambios se dan en un período durante el cual el cerebro es más receptivo, lo que permite lograr una mejor recuperación (37,38). Esta “ventana”, es esencial al hablar de la rehabilitación como herramienta terapéutica post-ictus.

### **2.5.2 El efecto de la inmunomodulación sobre la neuroplasticidad**

El sistema inmune influye sobre la neuroplasticidad post-ictus mediante citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF-, las cuales, además de sus efectos sobre el sistema inmune, pueden modificar la excitabilidad neuronal ya que pueden, por ejemplo, regular la función de receptores glutamatérgicos (39). En concentraciones fisiológicas pueden participar en plasticidad homeostática, pero cuando se mantienen elevadas después de la lesión favorecen hiperexcitabilidad, alteración

de la transmisión sináptica y menor eficiencia de la reorganización funcional (39,40).

De igual manera, la microglía funciona como un mediador directo de plasticidad estructural, ya que participa en vigilancia sináptica, fagocitosis de detritos, eliminación selectiva de sinapsis y remodelación de conexiones periinfarto; este proceso puede ser adaptativo cuando elimina conexiones dañadas, pero perjudicial si se amplifica mediante vías de complemento como C1q/C3, favoreciendo un deterioro cognitivo o funcional post-ictus (41,42).

Por último, los linfocitos reguladores pueden modular la plasticidad indirectamente al reprogramar células gliales (43). Las Treg infiltrantes producen anfiringulina, que reduce la astrogliosis neurotóxica, y osteopontina, que actúa sobre receptores de integrinas en microglía para promover actividad reparativa, a través de oligodendrogenesis y reparación de sustancia blanca (43,44).

### **2.5.3 Rehabilitación y neuroplasticidad.**

Como se mencionó previamente, la rehabilitación es la principal herramienta terapéutica utilizada para el tratamiento de las secuelas del ictus, al proveer estímulos motores repetidos y orientados a tareas, los cuales promueven mecanismos de aprendizaje motor dependiente de actividad (45), y esta debe de realizarse dentro del periodo que el cerebro tiene la mayor capacidad de neuroplasticidad post-ictus, lo cual se ha tratado de definir en múltiples estudios clínicos, tratando de caracterizar el mejor momento para iniciar la rehabilitación post-ictus. Originalmente se consideraba que mientras antes se empezará la rehabilitación tenía un mejor pronóstico funcional a los 3 meses, pero el ensayo AVERT, que evaluó la rehabilitación en el tiempo hiperagudo post ictus, la cohorte que recibió movilización muy temprana presentó un peor pronóstico funcional a los 3 meses posteriores al infarto cerebral (46).

Sin embargo, se sabe que el inicio tardío puede perder parte del efecto terapéutico, el estudio CPASS aportó evidencia clínica de una ventana para rehabilitación motora de miembro superior, mostrando que 20 horas adicionales de terapia tuvieron mayor efecto cuando se administraron entre los 60 y 90 días posteriores al ictus, menor efecto cuando se administraron antes de los 30 días y ausencia de efecto significativo cuando se iniciaron a los 6 meses o más (47).

Además de la ventana de inicio para la rehabilitación, también se sabe que distintos esquemas de rehabilitación tienen éxitos terapéuticos distintos. Las modalidades de rehabilitación post-ictus incluyen, entre otras, terapia física dirigida a movilidad, fuerza, equilibrio y marcha; terapia ocupacional orientada a actividades de la vida diaria y recuperación funcional del miembro superior; y estrategias intensivas o asistidas por tecnología, como entrenamiento orientado a tareas, realidad virtual, terapia robótica o estimulación no invasiva, cuyo objetivo es aumentar la repetición, la intensidad y la retroalimentación sensoriomotor (48). Los esquemas basados en entrenamiento orientado a tareas enfatizan la práctica repetida de actividades funcionales específicas, como alcanzar, manipular objetos, caminar o transferirse, con el objetivo de inducir aprendizaje motor dependiente de actividad y reorganización de circuitos motores (48,49). Así que, al no estar establecido el mejor tiempo ni esquema para la rehabilitación post-ictus, existe un hueco en la literatura sobre este tema. “Actualmente no existe un consenso claro sobre el protocolo más efectivo para mejorar la condición de los pacientes post-ictus”, como describe Szurlej y colaboradores (50), principalmente por la falta de biomarcadores, que permitan monitorizar y predecir la recuperación post-ictus.

## **2.6 Biomarcadores: definición, clasificación y aplicabilidad clínica.**

El término biomarcador se define como una característica medible que actúa como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas a una exposición o intervención terapéutica (51). Esta definición, de

NIH/FDA, distingue además categorías funcionales como biomarcadores diagnósticos, pronósticos, predictivos, de monitoreo, farmacodinámicos o de respuesta, de susceptibilidad/riesgo y de seguridad. De manera traslacional, los biomarcadores permiten vincular mecanismos fisiopatológicos con desenlaces clínicos, facilitar la estratificación de pacientes y apoyar la evaluación objetiva de intervenciones terapéuticas (51).

En el ictus isquémico, el interés por los biomarcadores ha aumentado debido a la heterogeneidad clínica y biológica de la enfermedad, así como a la limitada capacidad de las variables clínicas aisladas para capturar la complejidad del daño cerebral, la reparación y la recuperación funcional (6,52). Aunque múltiples biomarcadores sanguíneos han mostrado potencial para mejorar la evaluación diagnóstica y pronóstica del ictus, su implementación rutinaria aún enfrenta retos de validación analítica, reproducibilidad y utilidad clínica, por lo que actualmente se considera más prometedor un enfoque de múltiples marcadores integrado con variables clínicas (52).

## **2.7 Biomarcadores en ictus isquémico**

Los biomarcadores en ictus pueden ser indicativos de distintos procesos en distintos periodos, desde la expansión de la lesión, la disrupción de la barrera hematoencefálica hasta el reclutamiento celular procesos de resolución y reparación.

### **2.7.1 Biomarcadores inflamatorios en ictus isquémico**

En el ictus isquémico, se han estudiado biomarcadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10 y MMP-9, entre otros, por su asociación con severidad, evolución funcional y complicaciones del ictus (53).

La interpretación de estos marcadores debe considerar que la inflamación post-ictus es dinámica y temporalmente dependiente, pasando por una respuesta aguda, caracterizada principalmente por ser una respuesta inmunológica aguda (12). Un mismo mediador puede asociarse con daño en fases tempranas y con reparación en etapas posteriores (53). Esta temporalidad es importante en estudios orientados a rehabilitación, donde el interés no está solamente en el evento agudo, sino en cómo el entorno inflamatorio acompaña o limita la recuperación funcional (54).

### **2.7.2 Factores de crecimiento como biomarcadores**

Diversos factores de crecimiento vascular y neurotróficos han sido propuestos como biomarcadores de plasticidad, los cuales modifican la respuesta a la rehabilitación entre ellos BDNF, IGF-1 y VEGF (54). La evidencia disponible sugiere que el ejercicio aeróbico en sobrevivientes de ictus puede incrementar concentraciones circulantes de BDNF, IGF-1 y VEGF, lo que respalda la idea de que la rehabilitación no solo induce cambios funcionales observables mediante escalas clínicas, sino también modificaciones biológicas medibles en sangre (54,55).

### **2.7.3 MicroARNs como biomarcadores emergentes en ictus**

Los microARNs son moléculas pequeñas de ARN no codificante que regulan la expresión génica de forma postranscripcional y pueden regular procesos clave como inflamación, apoptosis, angiogénesis, excitotoxicidad y plasticidad neuronal (56). Su estabilidad relativa en fluidos biológicos y su detección en suero o plasma los han posicionado como candidatos atractivos para el desarrollo de biomarcadores no invasivos en ictus (57).

Estudios recientes y revisiones contemporáneas sostienen que los miARNs circulantes tienen potencial diagnóstico y pronóstico en ictus isquémico, aunque persisten limitaciones metodológicas importantes relacionadas con el

momento del muestreo, el tipo de muestra, la estrategia de normalización y la falta de validación multicéntrica (58,59). Por ello, más que biomarcadores utilizados en práctica clínica actual, los miARNs deben considerarse actualmente biomarcadores emergentes con alto valor de investigación traslacional (57,60).

## **2.8 Integración de biomarcadores y escalas clínicas en la respuesta a rehabilitación**

A pesar de las distintas moléculas utilizadas como biomarcadores, las escalas clínicas continúan siendo la herramienta central para evaluar la severidad neurológica, la discapacidad global y la recuperación funcional después del ictus; sin embargo, por sí solas no permiten capturar de manera directa los mecanismos biológicos que subyacen a la mejoría o al fracaso terapéutico (61). Por eso, la integración de biomarcadores con escalas clínicas es una aproximación más que permite mejorar la caracterización de la recuperación, identificar subgrupos de pacientes y avanzar hacia modelos de rehabilitación más personalizados en base a las necesidades individuales de cada paciente (53).

Dado que todavía no existe un perfil que relacione de manera sistemática el perfil biológico del paciente con la intensidad, temporalidad o tipo de rehabilitación, la búsqueda de biomarcadores inflamatorios, neurotróficos y transcriptómicos representa una necesidad en la literatura y su validación podría contribuir a la implementación de marcadores séricos como indicadores de mayor plasticidad para la optimización en la toma de decisiones terapéuticas en pacientes post-ictus (53,54).

## **2.9 Herramientas bioinformáticas, metaanálisis de expresión génica y análisis *in silico* en la identificación de biomarcadores**

Actualmente, la búsqueda de biomarcadores en ictus, o en cualquier campo, ha evolucionado desde el estudio de moléculas individuales hacia estrategias de biología de sistemas apoyadas en herramientas bioinformáticas

para la identificación de potenciales biomarcadores (62). La transcriptómica de sangre periférica ha adquirido especial relevancia, ya que permite estudiar de manera accesible la respuesta sistémica al daño cerebral y capturar firmas moleculares asociadas con inflamación, coagulación, reparación tisular, subtipo etiológico y desenlaces clínicos (63,64). Además, se ha documentado que el transcriptoma periférico puede reflejar parte de la comunicación bidireccional entre el cerebro lesionado y el sistema inmune periférico, lo que lo convierte en una fuente atractiva para el descubrimiento de biomarcadores con potencial traslacional (65,66).

Dentro de estas estrategias, el metaanálisis de expresión génica constituye una herramienta especialmente útil, ya que integra múltiples cohortes transcriptómicas independientes para aumentar la potencia estadística, reducir la dependencia de hallazgos propios de una sola muestra y detectar señales moleculares más robustas y reproducibles (67). En biomarcadores transcriptómicos, además, se han propuesto enfoques que no solo consideran la significancia estadística, sino también la concordancia en la dirección del cambio y la relevancia biológica entre estudios, con el fin de priorizar candidatos con mayor probabilidad de validación externa (67,68).

A partir de estos datos, el análisis bioinformático suele incluir un análisis de expresión diferencial permite reconocer genes sobreexpresados o subexpresados entre casos y controles o entre subgrupos clínico, análisis de enriquecimiento funcional, como Gene Ontology (GO) (69), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (70), Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (71) o Gene Set Variation Analysis (GSVA) (72), que permiten interpretar dichos genes dentro de procesos biológicos, rutas de señalización y programas celulares y los análisis de regulación por factores de transcripción o microARNs como miRWalk (73), ayudan a construir una visión mecanística más integrada de los biomarcadores candidatos identificados (74).

En conjunto, estas tecnologías facilitan la identificación de biomarcadores no solo por su magnitud de cambio, sino también por su especificidad celular y su distribución espacial, lo que incrementa su plausibilidad biológica y su valor potencial como dianas terapéuticas o marcadores de evolución (75). Por eso, los hallazgos *in silico* deben entenderse como una etapa de descubrimiento y refinamiento, más que como prueba definitiva de utilidad clínica (74).

Este enfoque en ictus resulta especialmente pertinente ante la ausencia de un marco biológico estandarizado que guíe la rehabilitación, ya que proporciona una base racional para avanzar hacia modelos de medicina de precisión sustentados en perfiles moleculares dinámicos del paciente (76).

## **2.10 ANTECEDENTES**

Distintos trabajos han propuesto que los biomarcadores sanguíneos podrían complementar la evaluación clínica al reflejar procesos de inflamación, estrés oxidativo, angiogénesis, plasticidad sináptica y remodelación vascular durante la recuperación post-ictus (77,78).

Uno de los primeros estudios en evaluar el perfil inmunológico durante la rehabilitación fue el de Manolescu et al., quienes evaluaron la dinámica de marcadores inflamatorios en pacientes post-ictus en fase post-aguda sometidos a rehabilitación. En este trabajo se midieron concentraciones plasmáticas de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , sICAM-1 y lipoproteína(a), comparando pacientes con controles sanos. Los autores reportaron concentraciones elevadas de IL-6, TNF- $\alpha$  y lipoproteína(a) en los pacientes post-ictus, lo que sugirió persistencia de inflamación sistémica durante la etapa de rehabilitación (79).

En una línea similar, Yeh et al. analizaron la asociación entre sueño, inflamación, estrés oxidativo y desenlaces funcionales después de rehabilitación en pacientes subagudos. Incluyeron 20 sobrevivientes de ictus sometidos a

cuatro semanas de rehabilitación de miembro superior y midieron sICAM-1, glutatión peroxidasa y malondialdehído (80). Los autores observaron disminución significativa de MDA después de la intervención, junto con mejoría en mRS, Wolf Motor Function Test y Stroke Impact Scale (80).

Por su parte, Ma et al., estudiaron metaloproteinasas de matriz en pacientes con ictus isquémico sometidos a terapia intensiva de rehabilitación. El estudio evaluó MMP-3, MMP-12 y MMP-13 durante tres meses de seguimiento, en pacientes sometidos a rehabilitación intensiva de al menos tres horas por día, cinco días por semana (81). Ellos reportaron asociaciones entre MMP-3 y recuperación motora, lo cual es relevante porque las MMPs, aunque usualmente se asocian con disrupción de barrera hematoencefálica y daño agudo, también participan en remodelación extracelular, plasticidad y reparación tisular durante fases posteriores (81).

Por otro lado, el grupo de Gabriel-Salazar et al. realizó evaluaciones del mismo tipo de rehabilitación al evaluar angiogenina y células progenitoras endoteliales en pacientes con ictus isquémico sometidos a rehabilitación intensiva (82). En este estudio, los niveles séricos de angiogenina aumentaron después de un mes de rehabilitación intensiva y encontraron una correlación fuerte entre los niveles en suero de angiogenina y el score de Barthel ( $R = 0.618$ ,  $p = 0.014$ ), una escala de independencia funcional. Además, las poblaciones de células progenitoras endoteliales aumentaron después del ictus y permanecieron elevadas durante el seguimiento (82).

Por último, Koroleva et al. evaluaron BDNF sérico durante recuperación temprana asistida por entrenamiento motor con realidad aumentada. Incluyeron 50 pacientes después de ictus isquémico y midieron BDNF el primer día, día 14, antes de rehabilitación basada en realidad aumentada y después de la intervención (83). Los niveles de BDNF aumentaron significativamente durante la fase de rehabilitación con realidad aumentada, mientras que los pacientes no

tratados tuvieron niveles menores al final del seguimiento. Este trabajo es relevante porque sugiere que el BDNF puede comportarse como marcador dinámico de entrenamiento motor durante la recuperación (83).

Como se puede observar, la literatura sobre marcadores de recuperación durante la rehabilitación post-ictus es muy heterogénea, con distintos biomarcadores evaluados en distintos puntos de tiempo y con distintos esquemas de rehabilitación evaluados, por lo que, se necesita una evaluación más exhaustiva de múltiples marcadores en un esquema de rehabilitación integral.

### **CAPÍTULO III | JUSTIFICACIÓN**

El ictus isquémico es una causa importante de discapacidad y mortalidad. La inflamación contribuye significativamente al daño neuronal y, por ende, modula la recuperación funcional. Ante la ausencia de un esquema de rehabilitación estandarizado y la heterogeneidad de los resultados clínicos, es crucial identificar biomarcadores solubles que, al ser cuantificados durante un esquema de terapia integral, permitan predecir objetivamente el éxito de la intervención y optimizar la recuperación funcional.

## **CAPÍTULO IV | HIPÓTESIS**

### **4.1 Hipótesis nula**

La elevación de biomarcadores proinflamatorios y quimiocinas no se asocia con un peor desenlace funcional en pacientes post-ictus isquémico en fase subaguda, sometidos a rehabilitación integral.

### **4.2 Hipótesis alterna**

La elevación de biomarcadores proinflamatorios y quimiocinas se asocia con un peor desenlace funcional en pacientes post-ictus isquémico en fase subaguda, sometidos a rehabilitación integral.

## CAPÍTULO V | OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar de manera longitudinal el perfil de biomarcadores circulantes (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y microARNs) en pacientes post-ictus isquémico en fase subaguda, sometidos a un esquema de rehabilitación integral, y establecer su asociación con la recuperación funcional.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Identificar *in silico*, las vías moleculares alteradas asociadas a la regulación de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y microARNs implicados en la respuesta inflamatoria de pacientes con ictus isquémico.
- II. Determinar la concentración plasmática de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en pacientes post-ictus isquémico en fase subaguda, en los tiempos basal, al mes y a los 3 meses de la rehabilitación integral.
- III. Determinar la expresión relativa de microARNs circulantes en plasma en los tiempos basal, al mes y a los 3 meses de la rehabilitación integral.

## CAPÍTULO VI | MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño del estudio

Para la identificación biomarcadores candidatos se realizó un estudio secundario, observacional y analítico *in silico*, basado en la recuperación y análisis de perfiles transcriptómicos públicos de pacientes con ictus isquémico y controles, disponibles en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El propósito de esta fase fue identificar firmas de expresión génica y alteraciones en vías moleculares relacionadas con la respuesta inmune sistémica en sangre periférica asociadas al ictus isquémico.

### 6.2 Estrategia de búsqueda y fuentes de información del análisis *in silico*.

La búsqueda de series transcriptómicas se realizó en la base de datos NCBI GEO utilizando la siguiente estrategia:

*("ischemic stroke" OR stroke OR "cerebral infarction" OR "brain ischemia") AND (plasma OR serum OR "whole blood" OR blood OR PBMC OR "peripheral blood")*

La búsqueda se restringió a estudios en **Homo sapiens** y a los siguientes tipos de plataforma:

- **Expression profiling by array**
- **Expression profiling by high throughput sequencing**

Se consideraron únicamente estudios realizados en muestras de sangre periférica o sus fracciones, con el fin de identificar biomarcadores potencialmente accesibles y de utilidad traslacional.

### 6.3 Criterios de selección de estudios transcriptómicos

#### 6.3.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron series transcriptómicas que cumplieran con los siguientes criterios:

1. Estudios en humanos (Homo sapiens).
2. Series con perfiles de expresión génica obtenidos por microarreglos o secuenciación de alto rendimiento.
3. Estudios que incluyeran pacientes con diagnóstico de ictus isquémico.
4. Series con grupo control y grupo de ictus isquémico para comparación.
5. Estudios con información clínica suficiente para identificar de manera clara el tiempo post-ictus o la etapa temporal de obtención de la muestra.
6. Disponibilidad de tablas de expresión o conteo ya normalizadas en GEO, aptas para análisis secundarios.
7. Series cuyo tejido fuera sangre o sus derivados

### **6.3.2 Criterios de exclusión:**

1. Estudios en modelos animales, cultivos celulares o sistemas in vitro.
2. Estudios intervencionales.
3. Series sin definición clara del tiempo post-ictus.
4. Series sin grupo control o sin grupo de ictus isquémico.

### **6.3.3 Selección de series y extracción de datos**

La selección de las series se realizó mediante revisión del título, resumen, tipo de plataforma, diseño experimental y características de las muestras reportadas en GEO. Posteriormente, de cada serie elegible se recuperó la información correspondiente a:

- identificador GEO,
- tipo de plataforma,
- tipo de muestra biológica,
- número de muestras por grupo,
- tiempo post-ictus,
- Disponibilidad de matriz de expresión o tabla de conteos normalizados.

Cuando estuvieron disponibles, se utilizaron las tablas de expresión normalizadas depositadas en GEO como insumo principal para el análisis. En las series basadas en microarreglos, se empleó además la herramienta GEO2R para contrastar grupos y obtener genes diferencialmente expresados dentro de cada conjunto de datos.

## **6.4 Análisis *in silico* de perfiles transcripcionales de sujetos post-ictus**

### **6.4.1 Análisis de expresión diferencial**

Los perfiles transcriptómicos seleccionados fueron analizados de manera independiente según el tipo de plataforma. En los estudios de microarreglos, el análisis diferencial inicial se realizó con GEO2R, herramienta en línea de GEO basada en modelos lineales para comparación de grupos. En los estudios con secuenciación de RNA, se emplearon las matrices de conteos o expresión ya normalizadas disponibles en los registros seleccionados.

Para el procesamiento de las matrices de conteo (RNA-seq), se utilizó el paquete DESeq2 de R. La significancia estadística se estableció con un valor de  $p$  ajustada ( $p$  adj.)  $< 0.05$  y el umbral de cambio de expresión se fijó en  $|\log_2FC| \geq 1$ .

Posteriormente, los genes identificados en los distintos conjuntos de datos se integraron para explorar patrones biológicos comunes entre estudios. El enfoque principal estuvo orientado a la caracterización de procesos inmunológicos sistémicos vinculados con el ictus isquémico.

#### **6.4.2 Análisis de sobrerrepresentación y enriquecimiento de vías**

Con el objetivo de interpretar funcionalmente las alteraciones transcriptómicas identificadas, se realizó un análisis de sobrerrepresentación y enriquecimiento de vías moleculares mediante Gene Set Variation Analysis (GSVA). Para ello se utilizaron conjuntos de genes relacionados con el sistema inmune, a fin de evaluar la participación de rutas biológicas inmunológicas en las muestras de pacientes con ictus isquémico en comparación con los controles.

Este análisis permitió estimar la activación relativa de vías inmunes a nivel de muestra y explorar si existían patrones consistentes de desregulación inmunológica entre los diferentes estudios incluidos. La selección de rutas se enfocó en procesos relacionados con inflamación, activación leucocitaria, señalización por citocinas, respuesta innata y adaptativa, migración celular e inmunorregulación.

#### **6.4.3 Variables de interés del objetivo *in silico***

Las principales variables de interés para esta fase fueron:

- expresión diferencial de genes entre ictus isquémico y controles,
- dirección del cambio transcripcional (sobreexpresión o subexpresión),
- enriquecimiento de vías inmunológicas,
- consistencia de firmas transcriptómicas entre plataformas y series independientes
- identificación de genes y rutas potencialmente útiles como biomarcadores sanguíneos.

#### **6.5 Evaluación longitudinal de biomarcadores proinflamatorios en una cohorte post-ictus isquémico durante un esquema de rehabilitación integral**

### **6.5.1 Diseño del estudio**

Para la evaluación y validación de los biomarcadores identificados se realizó un estudio clínico, prospectivo, longitudinal y analítico, derivado de una cohorte de pacientes con antecedente reciente de infarto cerebral isquémico reclutados en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y seguidos durante un programa de rehabilitación integral en la Unidad de Neuromodulación y Plasticidad Cerebral del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL. El protocolo general se planteó como un estudio de cohorte prospectiva, analítico, de casos y controles.

### **6.5.2 Población de estudio**

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de infarto cerebral agudo en territorio de la arteria cerebral media, confirmado por tomografía o resonancia magnética, con menos de 30 días de evolución, edad de 30 a 80 años, independencia funcional previa al evento, puntaje NIHSS entre 6 y 20, déficit motor en extremidad superior y comprensión del lenguaje conservada. Se excluyeron pacientes con infartos en otros territorios, discapacidad funcional previa, alteración del estado de alerta, enfermedades sistémicas graves o condiciones que interfirieran con la evaluación clínica. Se consideraron como criterios de eliminación la recurrencia de evento vascular cerebral, muerte, mala adherencia al tratamiento médico o asistencia irregular al programa de rehabilitación.

### **6.5.3 Programa de rehabilitación integral y seguimiento clínico**

Todos los pacientes recibieron un programa de rehabilitación integral que incluyó rehabilitación física y reeducación cognitiva, con una frecuencia de tres sesiones por semana y seguimiento hasta 6 meses. Cada sesión tuvo una duración aproximada de 90 minutos, distribuidos en 50 minutos de rehabilitación física y 40 minutos de rehabilitación cognitiva.

El componente físico incluyó evaluación basal y reevaluaciones al mes, a los 3 y a los 6 meses mediante escalas funcionales y motoras, la escala de Lovett de fuerza muscular, la escala de Barthel de independencia funcional orientada a tareas de la vida diaria, la escala de ictus de la NIH (NIHSS) para deterioro neurológico y la escala modificada de Rankin para independencia funcional.

#### **6.5.4 Tiempos de evaluación y obtención de muestras biológicas**

A los pacientes se les obtuvieron muestras sanguíneas al ingreso al protocolo, que corresponde a la muestra antes del inicio de su rehabilitación integral y posteriormente al mes de su inicio y a los 3 meses posteriores. De acuerdo con el protocolo, se recolectaron muestras de suero, plasma. Las muestras de suero y plasma fueron almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **6.5.5 Determinación de concentraciones plasmáticas de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento**

La cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se realizó en plasma mediante la plataforma Bio-Plex Pro Human Cytokine Assays (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante para el panel multiplex de 48 analitos. El ensayo está diseñado para cuantificar 48 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero y plasma, entre otros tipos de muestra.

De acuerdo con el manual del fabricante, las muestras de plasma fueron procesadas bajo formato de inmunoensayo tipo sándwich sobre microesferas magnéticas, con lectura en sistema Luminex/Bio-Plex y análisis basado en intensidad de fluorescencia media y concentración calculada a partir de curva estándar. El protocolo recomienda una dilución 1:4 para muestras de suero y plasma y especifica condiciones de incubación, lavado, detección y adquisición de datos estandarizadas para el panel.

Se analizaron las concentraciones plasmáticas de los 48 analitos incluidos en el panel: CTACK, eotaxina, FGF básico, G-CSF, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , HGF, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-12(p40), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IP-10, LIF, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ,  $\beta$ -NGF, PDGF-BB, RANTES, SCF, SCGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL y VEGF-A.

#### **6.5.6 Determinación de la expresión relativa de microARNs en plasma.**

La extracción de RNA libre circulante a partir de muestras de plasma se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante mediante el kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN), diseñado para la purificación de RNA total libre de células, incluyendo microARNs y otros ARNs pequeños, a partir de pequeños volúmenes de suero o plasma. De acuerdo con el manual del kit, este método permite la recuperación de RNA total, principalmente RNA de pequeño tamaño, a partir de 200  $\mu$ L de plasma, mediante un protocolo libre de fenol basado en lisis con guanidina, remoción de inhibidores y purificación sobre membrana de sílica.

De manera resumida, las muestras de plasma fueron sometidas a lisis con Buffer RPL, seguida de una etapa de precipitación de proteínas e inhibidores con Buffer RPP. Posteriormente, el sobrenadante fue recuperado, mezclado con isopropanol y transferido a columnas RNeasy UCP MinElute, donde el RNA total, incluyendo microARNs, se unió a la membrana. Después de los lavados correspondientes con buffers del sistema y etanol, el RNA fue eluido en agua libre de ARNasas para su posterior análisis por RT-qPCR. El manual especifica que la muestra de partida recomendada es de 200  $\mu$ L, que el RNA purificado de plasma consiste principalmente en especies pequeñas, y que la elución final puede realizarse en 20  $\mu$ L de agua libre de ARNasas.

El protocolo se realizó bajo condiciones orientadas a minimizar contaminación por ARNasas y variabilidad preanalítica. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, el procesamiento de muestras de plasma para extracción de RNA libre circulante debe realizarse con separación oportuna del plasma y, de ser posible, con una segunda centrifugación para reducir restos celulares y contaminación por ácidos nucleicos derivados de células sanguíneas.

#### **6.5.7 Síntesis de cDNA y cuantificación de microARNs mediante ensayos TaqMan.**

Posterior a la extracción de RNA libre circulante en plasma, la cuantificación de microARNs se realizó mediante ensayos TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos ensayos están diseñados para detectar y cuantificar la forma madura de los microARNs mediante PCR en tiempo real, y son compatibles con RNA aislado de suero o plasma. El sistema requiere la preparación previa de plantillas de cDNA utilizando el TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, seguido de la amplificación específica de cada microARN mediante qPCR.

De acuerdo con el protocolo del fabricante, para muestras de sangre, suero o plasma se emplearon 2 µL del eluato de RNA por reacción para la preparación del cDNA. La síntesis de cDNA comprendió cuatro etapas secuenciales: adición de cola poli(A), ligación de adaptador, retrotranscripción universal y una etapa de pre-amplificación universal (miR-Amp), con el fin de incrementar uniformemente la cantidad de cDNA correspondiente a los microARNs presentes en la muestra.

La reacción de poliadenilación se realizó a 37 °C durante 45 minutos, seguida de una etapa de inactivación a 65 °C durante 10 minutos. Posteriormente, la ligación del adaptador se efectuó a 16 °C durante 60 minutos. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 42 °C durante 15 minutos, con una inactivación posterior a 85 °C durante 5 minutos. Finalmente, se realizó la

reacción de miR-Amp, con activación enzimática a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 14 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 3 segundos y alineamiento/extensión a 60 °C por 30 segundos, con una etapa final a 99 °C durante 10 minutos.

Para la PCR en tiempo real, el producto de miR-Amp se diluyó 1:10 y se utilizó como plantilla para reacciones de 20 µL, preparadas con TaqMan™ Fast Advanced Máster Mix, el ensayo TaqMan™ Advanced específico para cada microARN y agua libre de nucleasas, de acuerdo con las proporciones indicadas por el fabricante. Las condiciones de amplificación para el sistema de PCR en tiempo real consistieron en una activación inicial a 95 °C durante 20 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C y alineamiento/extensión a 60 °C, conforme a la plataforma empleada.

La normalización de la expresión se realizó utilizando de manera concomitante miR-361-5p y miR-186-5p como controles endógenos. No se empleó control exógeno. La estabilidad de ambos microARNs como referencias se evaluó posteriormente mediante RefFinder. La expresión relativa se calculó con el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de Livak, utilizando como calibrador la muestra obtenida antes del inicio de la rehabilitación para cada paciente.

## CAPÍTULO VII | RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* de potenciales biomarcadores de éxito terapéutico de un esquema de rehabilitación integral en pacientes post ictus isquémico.

#### 7.1.1 Identificación y selección de series transcriptómicas

Utilizando la estrategia de búsqueda en la base de datos NCBI Gene Expression Omnibus (GEO), se identificaron un total de 19 series transcriptómicas relacionadas con ictus isquémico en búsqueda mostró una mayor disponibilidad de datasets de RNA-seq en comparación con microarreglos (Tabla 1).

**Tabla 1. Bases de datos transcriptómicas de perfiles de expresión de sujetos con ictus isquémico identificadas en NCBI-GEO.**

ID	Tejido	Método	Tiempo
GSE233775	Plasma	RNA-seq	Agudo
GSE269195	Plasma	RNA-seq	Agudo
GSE255087	Plasma	RNA-seq	Agudo
GSE231431	Plasma	RNA-seq	Agudo
GSE110993	Plasma	RNA-seq	Agudo
GSE169353	Plasma	RNA-seq	Agudo
GSE199942	Suero	RNA-seq	Agudo
GSE202709	Sangre completa	RNA-seq	Agudo
GSE197829	Sangre completa	RNA-seq	Agudo
GSE202518	Sangre completa	RNA-seq	Agudo
GSE180470	Sangre completa	RNA-seq	Agudo
GSE285659	PBMCs	RNA-seq	Agudo
GSE122709	PBMCs	RNA-seq	Sub-agudo

<b>GSE255070</b>	Plasma	Microarreglo	Agudo
<b>GSE291442</b>	Plasma	Microarreglo	Agudo
<b>GSE201860</b>	Plasma	Microarreglo	Agudo
<b>GSE95204</b>	Plasma	Microarreglo	Agudo
<b>GSE124026</b>	Sangre completa	Microarreglo	Agudo
<b>GSE37587</b>	Sangre completa	Microarreglo	Agudo
<b>GSE22255</b>	PBMCs	Microarreglo	Crónico
<b>GSE55937</b>	Sangre completa	Microarreglo	Agudo

Se presentan las series transcriptómicas identificadas en NCBI-GEO relacionadas con ictus isquémico en humanos, clasificadas según identificador GEO, tipo de muestra biológica, plataforma de análisis y momento clínico de obtención de la muestra.

A partir de las series identificadas, se realizó un proceso de selección basado en tipo de muestra, plataforma y relevancia biológica para el estudio de biomarcadores circulantes post-ictus. De las series identificadas, se seleccionaron aquellas que cumplieran con criterios de análisis en sangre periférica, plasma o suero, estudios enfocados en RNA libre circulante y con adecuada comparabilidad entre grupos.

De los estudios de RNA-seq, se incluyeron las series GSE231431, GSE110993 y GSE169353 correspondientes a muestras de plasma, así como GSE122709, que incluye PBMCs en fase subaguda. En cuanto a microarreglos, se seleccionaron las series GSE255070, GSE291442, GSE201860 y GSE95204, todas con perfiles de expresión en plasma.

### **7.1.2 Procesamiento de datos y análisis de expresión diferencial**

Para el análisis transcriptómico, se utilizó la matriz de conteo de la serie GSE122709, la cual fue procesada en R mediante el paquete DESeq2. Se generó una matriz de expresión normalizada que permitió realizar comparaciones entre los grupos de fase aguda, subaguda y controles sanos.

Con un umbral de significancia de  $p \text{ adj.} < 0.05$  y un cambio absoluto de expresión de  $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ , se identificaron 4,031 DEGs en el contraste agudo vs control (1,927 sobreexpresados y 2,104 subexpresados), 6,579 DEGs en subagudo vs control (3,040 sobreexpresados y 3,539 subexpresados) y 104 DEGs en subagudo vs agudo (29 sobreexpresados y 75 subexpresados). A continuación, se muestran los 50 genes con menor valor de  $p \text{ adj.}$  para cada contraste (**Tablas 2-4**).

**Tabla 2. Top 50 genes diferencialmente expresados ictus isquémico agudo y controles sanos.**

AGUDO VS CONTROL		
Gen	Tasa de cambio log2	p adj.
GPX1	2.322	1.07e-19
CNIH1	1.581	1.51e-19
COLGALT2	-2.365	1.51e-19
SH3BGRL	1.751	4.67e-18
RGS18	2.471	7.57e-18
CCDC126	2.433	7.57e-18
LOC101927923	-2.833	7.57e-18
LOC107986477	-1.904	2.00e-17
CAP2P1	-2.189	2.35e-17
LPAR6	2.378	4.17e-17
PPBP	2.819	1.06e-16
HIST1H3G	4.158	2.91e-16
VAT1	1.311	2.91e-16
ND4L	-2.643	2.91e-16
MGEA5	-1.154	4.26e-16
SNORD133	3.877	2.00e-15

<b>SNORA32</b>	3.233	2.41e-15
<b>ZNF92</b>	3.145	2.64e-15
<b>MPLKIP</b>	1.908	3.03e-15
<b>ARL15</b>	1.807	4.74e-15
<b>HIST1H3B</b>	3.709	5.21e-15
<b>ARHGAP26-IT1</b>	-2.291	9.17e-15
<b>LINC01138</b>	-1.484	2.52e-14
<b>ASPM</b>	2.447	3.15e-14
<b>HIST1H2AG</b>	3.284	4.01e-14
<b>AASDHPPT</b>	1.501	4.01e-14
<b>GMFB</b>	2.74	4.78e-14
<b>SCARNA2</b>	2.864	5.69e-14
<b>HIST1H3F</b>	3.347	6.97e-14
<b>LOC105373117</b>	-1.856	1.11e-13
<b>CCNG1</b>	1.739	1.40e-13
<b>ARL6IP5</b>	1.189	1.40e-13
<b>ERP27</b>	-1.572	1.40e-13
<b>LOC107984984</b>	-1.82	1.40e-13
<b>LOC107986461</b>	-2.921	1.45e-13
<b>LOC105372976</b>	-1.683	1.56e-13
<b>SNORA94</b>	2.251	1.61e-13
<b>GPX1P1</b>	2.634	1.68e-13
<b>RPL18A</b>	1.473	2.95e-13
<b>LOC107986465</b>	-2.038	2.95e-13
<b>HIST1H4I</b>	2.863	3.38e-13
<b>HIST1H4A</b>	2.945	3.67e-13
<b>ATP6</b>	-2.231	6.46e-13
<b>MTATP6P1</b>	-2.337	7.19e-13
<b>HIST1H4D</b>	2.845	7.86e-13
<b>HIST1H3D</b>	2.799	7.91e-13
<b>CLDND2</b>	-1.812	8.03e-13

<b>HIST1H2AJ</b>	3.457	9.76e-13
<b>EMBP1</b>	1.604	1.08e-12
<b>PHBP19</b>	-2.551	1.18e-12

Se muestran los 50 genes diferencialmente expresados con menor valor de  $p$  ajustada en el contraste indicado. La tasa de cambio se expresa como  $\log_2FC$ , donde valores positivos indican sobreexpresión y valores negativos indican expresión a la baja en el primer grupo del contraste respecto al segundo. La significancia estadística se reporta como  $p$  ajustada para múltiples comparaciones.

**Tabla 3. Top 50 genes diferencialmente expresados ictus isquémico subagudo y controles sanos.**

**SUBAGUDO VS CONTROL**

Gen	Tasa de cambio log2	p adj.
<b>CAP2P1</b>	-3.342	5.15e-38
<b>GPX1</b>	2.973	3.03e-34
<b>LOC107984984</b>	-2.84	7.63e-31
<b>PPBP</b>	3.724	6.69e-30
<b>NDUFA4</b>	1.955	1.63e-29
<b>LOC107986477</b>	-2.447	2.07e-29
<b>LOC105372976</b>	-2.474	2.85e-29
<b>GFOD1</b>	-2.382	3.51e-29
<b>LOC105371692</b>	-2.811	3.56e-28
<b>ARHGAP26-IT1</b>	-3.224	4.26e-28
<b>MECP2</b>	-1.617	4.50e-28
<b>ND4L</b>	-3.419	4.50e-28
<b>LPAR6</b>	2.925	7.55e-27
<b>SNORA94</b>	3.081	4.68e-26

CNIH1	1.775	5.07e-26
LOC105373117	-2.538	5.52e-26
LOC101928524	-2.748	1.91e-25
RPL18A	2.008	3.26e-25
SH3GL1P1	-3.182	3.26e-25
SCARNA2	3.785	3.55e-25
RGS18	2.868	3.55e-25
LOC105370567	-2.635	9.02e-24
SPINT2	1.553	3.79e-23
RPL41P3	2.985	3.79e-23
CCDC126	2.702	4.98e-23
HIPK2	-2.31	4.98e-23
RUNX1-IT1	-2.808	1.05e-22
TAF15	-1.76	1.19e-22
SMARCA2	-1.612	1.56e-22
RPS14	1.754	1.92e-22
MTATP6P1	-3.049	2.27e-22
ND5	-3.673	2.37e-22
IMP3	1.873	2.66e-22
LOC105377031	-3.219	2.94e-22
RPL39	3.327	3.43e-22
APRT	1.909	5.23e-22
SH3BGRL	1.877	5.23e-22
RPS13	2.113	6.01e-22
LOC101928421	-1.966	6.84e-22
ZNF621	-1.798	9.12e-22
RPPH1	3.902	1.11e-21
ATP6	-2.847	1.15e-21
HIST1H4A	3.694	2.12e-21
PWWP2B	1.797	2.29e-21
HIST1H3D	3.555	2.55e-21

<b>TCEB2</b>	1.617	2.57e-21
<b>MGEA5</b>	-1.299	2.64e-21
<b>ZNF587</b>	-1.321	2.64e-21
<b>ERP27</b>	-1.947	2.68e-21
<b>TERC</b>	3.505	3.43e-21

Se muestran los 50 genes diferencialmente expresados con menor valor de  $p$  ajustada en el contraste indicado. La tasa de cambio se expresa como  $\log_2FC$ , donde valores positivos indican sobreexpresión y valores negativos indican expresión a la baja en el primer grupo del contraste respecto al segundo. La significancia estadística se reporta como  $p$  ajustada para múltiples comparaciones.

**Tabla 4. Top 50 genes diferencialmente expresados ictus isquémico agudo e ictus isquémico subagudo.**

#### AGUDO VS SUBAGUDO

<b>Gen</b>	<b>Tasa de cambio log2</b>	<b>p adj.</b>
<b>SH3GL1P1</b>	-1.659	2.95e-04
<b>RNU7-45P</b>	-1.485	1.44e-03
<b>MTND5P2</b>	-1.621	1.44e-03
<b>LOC107986553</b>	-1.266	3.75e-03
<b>TRAJ30</b>	-1.668	3.75e-03
<b>LINC00562</b>	-2.028	3.75e-03
<b>LOC105377031</b>	-1.475	4.14e-03
<b>CAP2P1</b>	-1.153	4.58e-03
<b>GCSHP3</b>	-1.115	4.64e-03
<b>LINC00341</b>	-1.116	4.64e-03
<b>SNORD43</b>	1.058	4.93e-03
<b>FRA10AC1</b>	-1.009	5.53e-03

<b>LOC105377303</b>	-1.77	5.53e-03
<b>LOC107986085</b>	-1.324	5.93e-03
<b>RN7SL57P</b>	-1.839	7.30e-03
<b>LOC107984984</b>	-1.019	8.07e-03
<b>LOC101926994</b>	-2.365	8.11e-03
<b>LOC105376934</b>	1.527	8.19e-03
<b>SSH1</b>	-1.043	9.90e-03
<b>C2orf69</b>	-1.014	1.15e-02
<b>ZNF485</b>	-1.094	1.49e-02
<b>TAF9P3</b>	-1.198	1.49e-02
<b>KLHL14</b>	-1.781	1.49e-02
<b>CEACAM8</b>	-2.334	1.49e-02
<b>PCYOX1</b>	-1.018	1.61e-02
<b>LOC105376306</b>	1.238	1.62e-02
<b>LOC107985388</b>	1.024	1.62e-02
<b>BCL9</b>	-1.022	1.62e-02
<b>TMSB4XP8</b>	1.013	1.66e-02
<b>RPL17P28</b>	-1.06	1.69e-02
<b>RNU6-1016P</b>	-1.375	2.24e-02
<b>ITGA9</b>	-1.869	2.25e-02
<b>BRCA1P1</b>	-1.911	2.40e-02
<b>B4GALT5</b>	-1.028	2.42e-02
<b>RNF138P1</b>	-1.218	2.51e-02
<b>LOC107985656</b>	1.371	2.56e-02
<b>BCL2L11</b>	-1.025	2.56e-02
<b>LOC105377675</b>	-1.143	2.56e-02
<b>CD24</b>	-1.756	2.56e-02
<b>SNORD32A</b>	1.095	2.61e-02
<b>SAV1</b>	-1.117	2.61e-02

<b>MCF2L2</b>	1.13	2.64e-02
<b>UBN1</b>	-1.198	2.68e-02
<b>RRM2</b>	-1.26	2.68e-02
<b>LOC100133331</b>	-1.948	2.68e-02
<b>HMG1P36</b>	4.008	2.74e-02
<b>MIR6732</b>	1.067	2.99e-02
<b>KCNAB3</b>	-1.323	2.99e-02
<b>LOC727896</b>	-1.177	3.00e-02
<b>KANK3</b>	1.498	3.00e-02

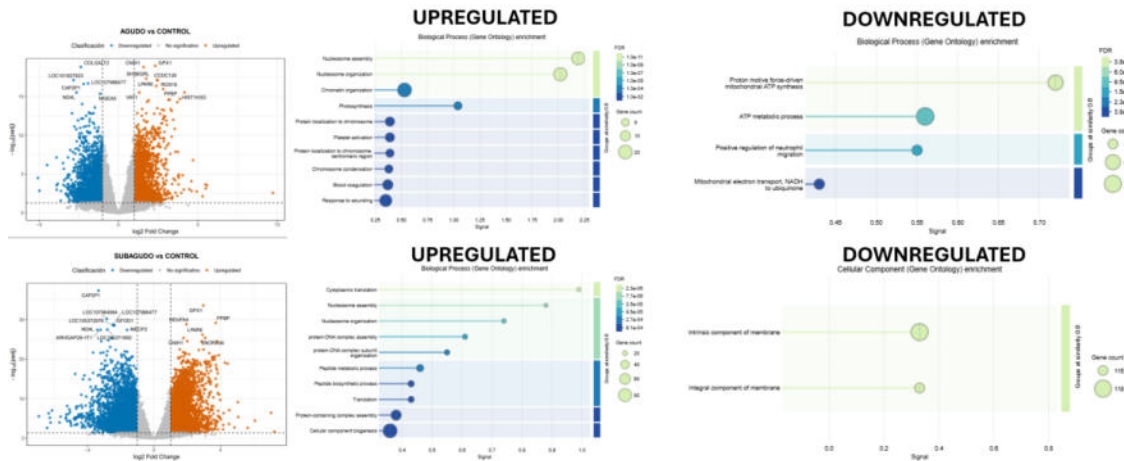
Se muestran los 50 genes diferencialmente expresados con menor valor de  $p$  ajustada en el contraste indicado. La tasa de cambio se expresa como  $\log_2FC$ , donde valores positivos indican sobreexpresión y valores negativos indican expresión a la baja en el primer grupo del contraste respecto al segundo. La significancia estadística se reporta como  $p$  ajustada para múltiples comparaciones.

### 7.1.3 Visualización global de la expresión diferencial y enriquecimiento funcional.

La distribución global de los genes diferencialmente expresados se visualizó mediante gráficos de volcán (**Figura 1**). En ambos contrastes principales (agudo vs control y subagudo vs control), se observó una gran cantidad de genes con cambios de expresión significativos.

El contraste subagudo vs control mostró una mayor cantidad de genes diferencialmente expresados y una mayor amplitud en los valores de  $\log_2FC$ , lo que sugiere una diferencia transcriptómica más evidente durante este periodo.

**Figura 1. Gráficos de volcán y enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados en ictus isquémico agudo y subagudo.**

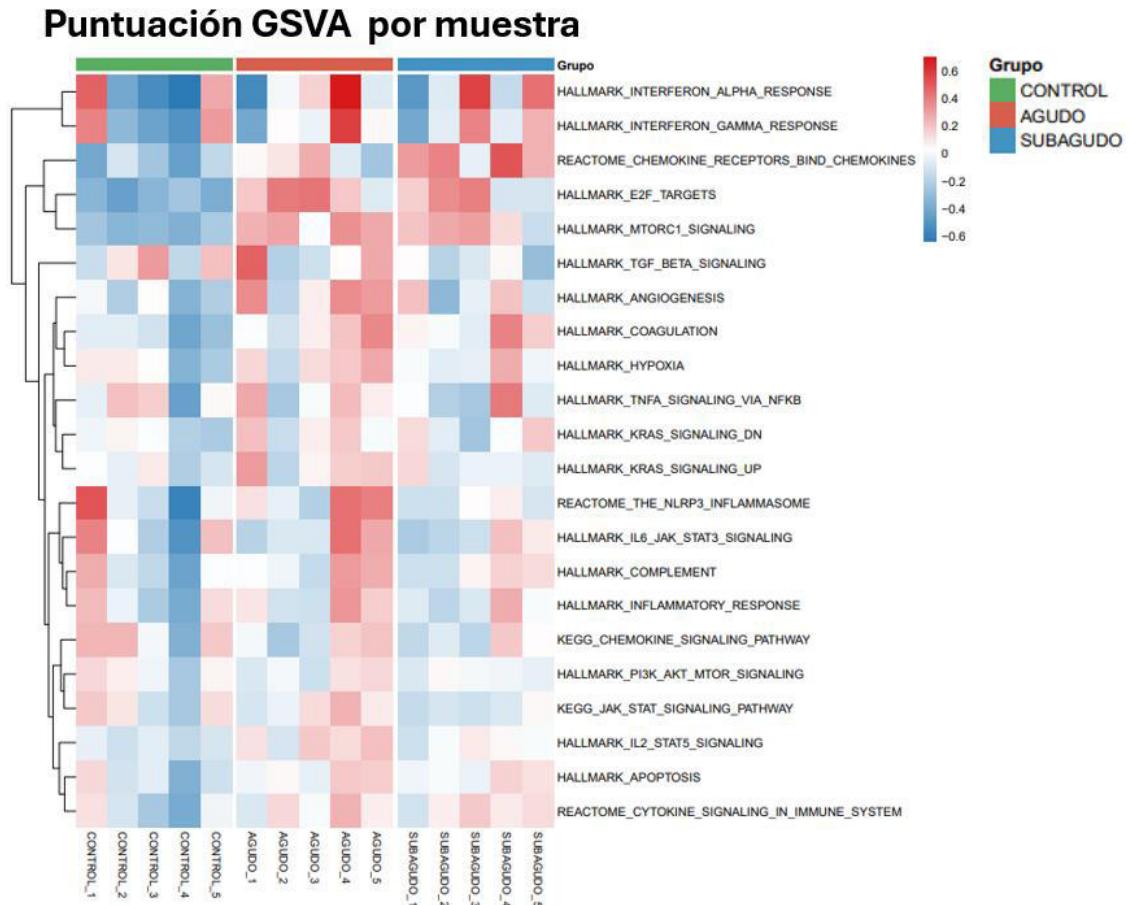


A la izquierda se presentan los genes diferencialmente expresados en gráficos de volcán: el eje X representa la tasa de cambio en  $\log_2$  ( $\log_2FC$ ), el eje Y representa la significancia estadística en escala  $-\log_{10}$ , cada punto representa un gen, en rojo los genes con  $\log_2FC > 1$  y en azul los genes con  $\log_2FC < -1$ . A la derecha, se presentan las principales vías enriquecidas de los genes diferencialmente expresados regulados a la alza y a la baja.

### 7.1.4 Análisis de enriquecimiento de vías inmunológicas mediante GSA

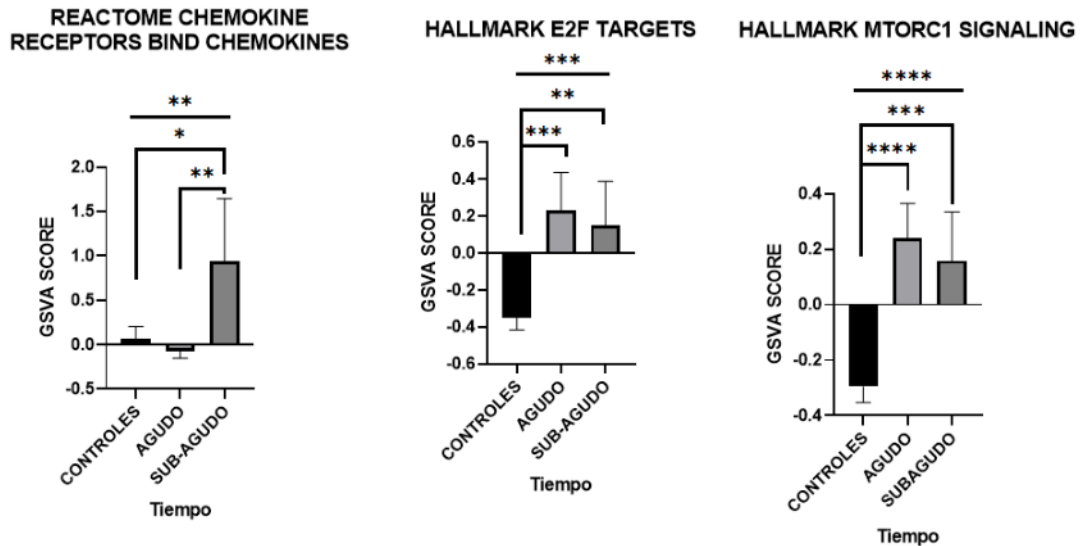
Al realizar el análisis de GSA para valorar el enriquecimiento de vías relacionadas con la respuesta inmune se obtuvo una matriz con los scores de cada vía en cada muestra, la cual a su vez se graficó como un mapa de calor. Los resultados se representaron en un mapa de calor (**Figura 2**) y se graficaron las vías con diferencias estadísticamente significativas en gráficas de barras por su distribución paramétrica (**Figura 3**).

**Figura 2. Mapa de calor de puntuación de GSVA de vías inflamatorias en ictus isquémico agudo, subagudo y controles sanos.**



Se muestra la activación relativa de vías inmunológicas seleccionadas mediante GSVA en muestras de pacientes con ictus isquémico agudo, ictus isquémico subagudo y controles sanos. Cada columna representa una muestra individual y cada fila corresponde a una vía biológica relacionada con inflamación, señalización por citocinas, quimiocinas, respuesta inmune innata o adaptativa. La intensidad del color representa el puntaje relativo de enriquecimiento por muestra, permitiendo visualizar patrones diferenciales de activación inmunológica entre los grupos analizados.

**Figura 3. Distribución de puntuaciones de GSVA de vías de interés en el tiempo subagudo.**

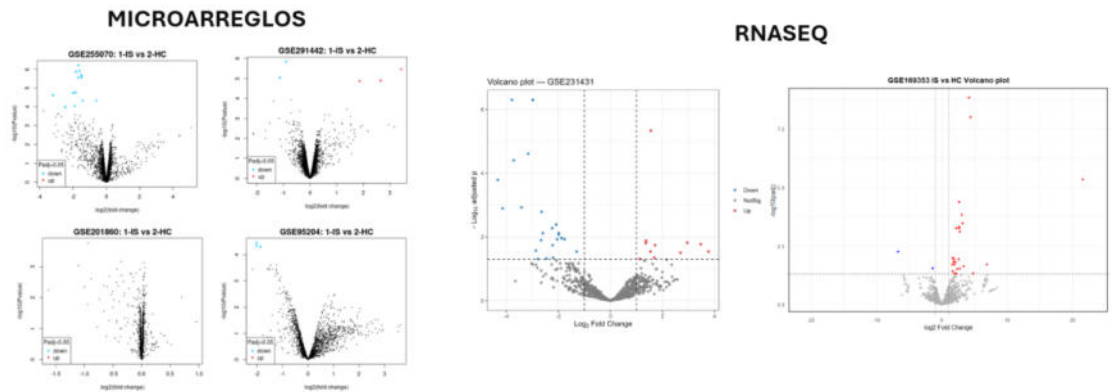


Se muestran las puntuaciones de enriquecimiento obtenidas mediante *Gene Set Variation Analysis* (GSVA) para vías inmunológicas seleccionadas en muestras de pacientes con ictus isquémico agudo, ictus isquémico subagudo y controles sanos. La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las gráficas fueron elaboradas en GraphPad Prism. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  ajustada  $< 0.05$ . \* =  $p$  adj.,  $< 0.05$ ; \*\* =  $p$  adj.,  $< 0.01$ ; \*\*\* =  $p$  adj.,  $< 0.001$ , \*\*\*\* =  $p$  adj.,  $< 0.0001$ .

### 7.1.5 Valoración de la expresión de microARNs en perfiles transcripcionales de suero y plasma.

Se calculó la expresión diferencial de microARNs en plasma de los datasets seleccionados y se obtuvieron matrices de expresión diferencial de cada una de las series (**Figura 4**), las cuales se utilizaron para encontrar microARNs que se encontraran diferencialmente expresados en 2 o más datasets, se graficaron los genes diferencialmente expresados en gráficos de volcán y los genes expresados en 2 o más datasets se presentan en un gráfico de Venn (**Figura 5**).

**Figura 4. Gráficos de volcán de datasets transcriptómicos en suero y plasma.**



Se muestran los gráficos de volcán generados a partir del análisis de expresión diferencial de microARNs en las series transcriptómicas seleccionadas de suero y plasma de pacientes con ictus isquémico y controles. Cada punto en cada grafica representa un microARN evaluado; el eje X muestra la magnitud del cambio de expresión en escala  $\log_2FC$ , mientras que el eje Y representa la significancia estadística en escala  $-\log_{10}$ . Los microARNs ubicados hacia la derecha corresponden a aquellos con expresión aumentada, mientras que los ubicados hacia la izquierda corresponden a microARNs con expresión disminuida en pacientes con ictus isquémico respecto a controles. En color rojo se encuentran los microARNs con  $p. \text{adj.} < 0.05$  y  $\log_2FC > 1$ , en color azul los microARNs con  $p. \text{adj.} < 0.05$  y  $\log_2FC < -1$ .

**Figura 5. Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados en los distintos datasets de suero y plasma.**

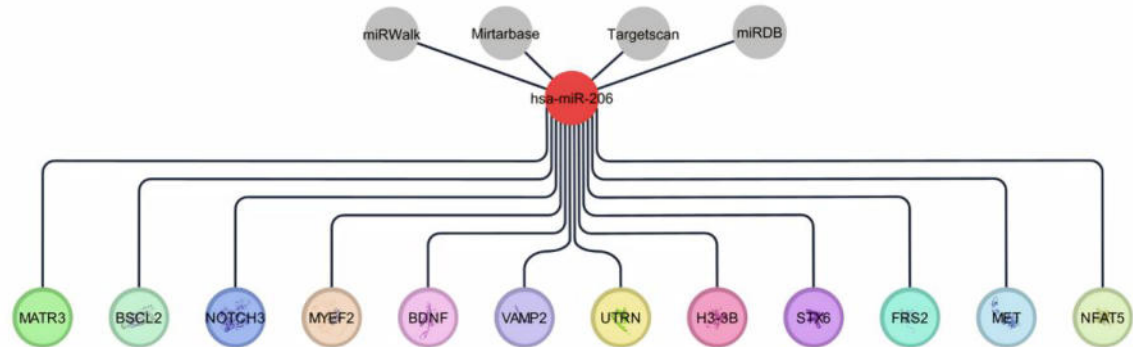


Se muestra el número de microARNs diferencialmente expresados identificados en los distintos datasets transcriptómicos seleccionados de suero y plasma de pacientes con ictus isquémico. Cada círculo representa una serie analizada, y las áreas de intersección indican los microARNs compartidos entre dos o más datasets.

### 7.1.6 Predicción de genes blanco de microARNs relevantes

Se realizó un análisis de predicción de genes blanco para miR-206 utilizando la herramienta miRWalk. Los resultados (**Figura 6**) mostraron múltiples genes potencialmente regulados por este microARN, configurando una red de interacciones que sugiere su posible participación en la regulación postranscripcional de procesos biológicos relevantes.

**Figura 6. Genes regulados por hsa-miR-206 predichos por el algoritmo miRWalk.**



Se muestra el conjunto de genes predichos como blancos potenciales de hsa-miR-206 mediante el algoritmo miRWalk, graficado en la plataforma Cytoscape, donde el nodo central rojo representa el microARN miR206, el cual conecta con los 4 algoritmos que contrasta la plataforma miRWalk para la predicción de genes diana, cada nodo de color representa un gen diana predicho.

En base a estos resultados, se consideran factores de crecimiento, quimiocinas y el miR206 como potenciales biomarcadores durante un esquema de rehabilitación integral para su validación in vivo durante un esquema de rehabilitación integral.

## **7.2 Evaluación longitudinal de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en una cohorte de sujetos post-ictus durante un esquema de rehabilitación integral.**

Para la evaluación longitudinal de distintos biomarcadores durante un esquema de rehabilitación integral, se reclutó una cohorte de sujetos con ictus isquémico reciente los cuales recibieron un esquema de rehabilitación integral por 3 meses durante los cuales se realizó la toma de muestras de sangre venosa periférica antes del inicio de la terapia integral, al mes de su inicio y a los 3 meses posteriores de su inicio. Estas muestras se utilizaron para la medición de biomarcadores, que incluían un panel de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, así como la determinación de la expresión relativa de microARNs

identificados en el análisis *in silico* para observar su comportamiento durante la rehabilitación. Para la determinación de la concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, se realizó un ensayo de Luminex para 48 moléculas en plasma de pacientes post ictus isquémico. Las concentraciones de estas se graficaron en un mapa de calor para facilitar su visualización y se realizaron pruebas estadísticas para encontrar diferencias en:

- a) Cada tiempo contra una cohorte control pareada.
- b) Cambios longitudinales a lo largo del tiempo

### **7.2.1 Características clínicas de la cohorte**

La cohorte analizada estuvo conformada por un total de 18 sujetos, distribuidos en 9 pacientes con antecedente de ictus isquémico y 9 controles sanos pareados por edad y sexo. La edad media global fue de  $51.5 \pm 15.4$  años, sin diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes ( $52.7 \pm 16.6$  años) y el grupo control ( $50.3 \pm 15.1$  años;  $p = 0.053$ ), sin embargo, presentan una tendencia a ser ligeramente mayor. La distribución por sexo fue homogénea entre grupos, con predominio del sexo masculino (77.8%) y una la misma proporción en la cohorte control, pero se encuentra una distribución muy heterogénea de la edad en ambos grupos.

### **7.2.2 Evolución clínica de los pacientes post-ictus durante un esquema de rehabilitación integral**

Durante el seguimiento longitudinal, los pacientes post-ictus fueron evaluados mediante escalas clínicas funcionales y motoras en los distintos puntos de tiempo establecidos en el protocolo. Se observó una tendencia hacia la mejoría clínica progresiva a lo largo del seguimiento, un fenómeno consistente con la evolución esperada bajo un esquema de rehabilitación integral.

Esta mejoría clínica fue heterogénea entre los pacientes, sin ninguna variable que determine el éxito de la rehabilitación integral o su recuperación post-ictus, lo que sustenta la necesidad de explorar biomarcadores que permitan caracterizar la trayectoria de recuperación de cada paciente y su respuesta a la rehabilitación.

### 7.2.3 Índice de respuesta global de los pacientes post-ictus durante la rehabilitación integral

El índice de respuesta global se utilizó como una medida global de la recuperación a lo largo de la rehabilitación, combinando la información de distintas escalas funcionales. Este enfoque permitió capturar de manera más robusta la evolución clínica de los pacientes, evitando la dependencia de una sola escala y reduciendo potenciales efectos de techo o piso.

La distribución de este índice evidenció diferencias en la magnitud de la respuesta entre pacientes, lo que permitió identificar patrones de mejoría diferencial dentro de la cohorte y facilitó su posterior correlación con biomarcadores plasmáticos y expresión de microARNs.

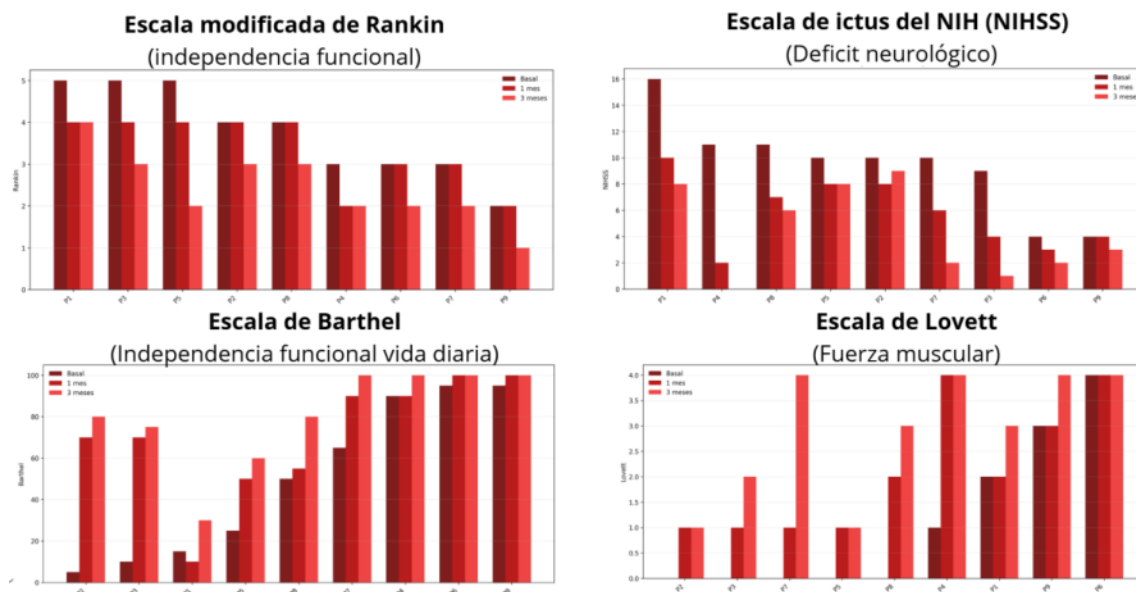
**Tabla 5. Características clínicas y funcionales basales de la cohorte de pacientes post-ictus isquémico y controles sanos**

Variable	Total (n = 18)	Stroke (n = 9)	Control (n = 9)	p
<b>Edad, años</b>	51.5 ± 15.4	52.7 ± 16.6	50.3 ± 15.1	0.053
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	14 (77.8)	7 (77.8)	7 (77.8)	—

<b>Sexo</b>	4 (22.2)	2 (22.2)	2 (22.2)	—
<b>femenino, n</b>				
<b>(%)</b>				

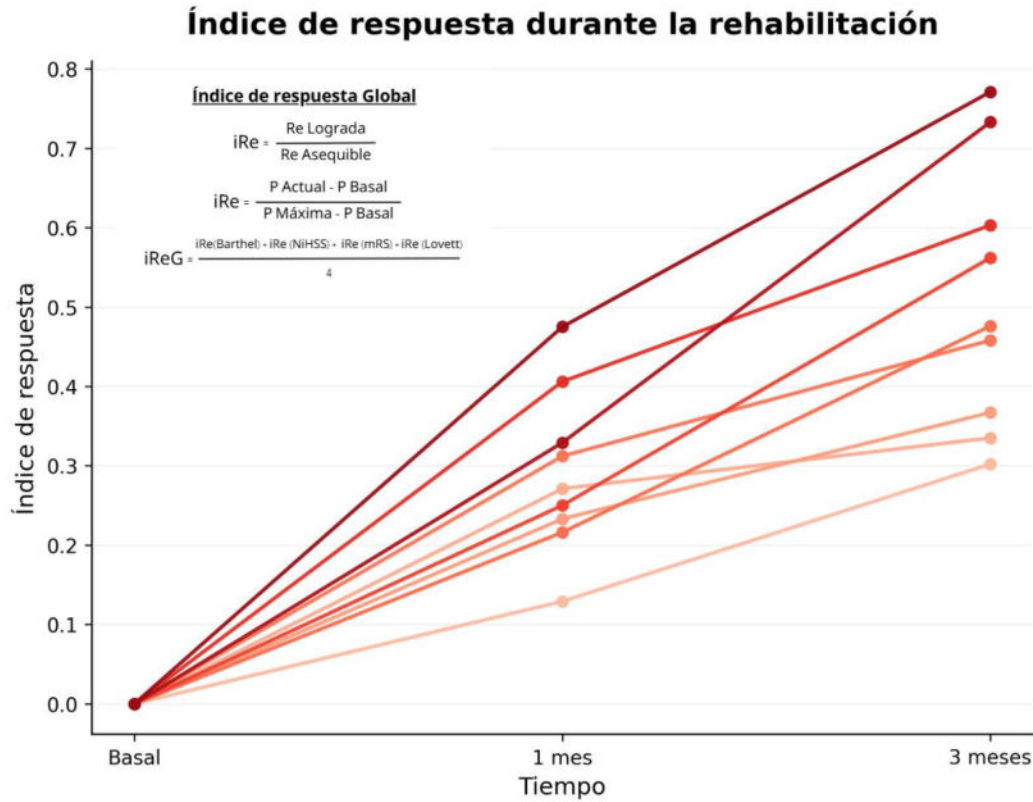
Los datos corresponden a las características clínicas de los pacientes incluidos en la cohorte al momento de su ingreso al protocolo, antes del inicio del esquema de rehabilitación integral. Las variables cuantitativas se presentan como media  $\pm$  desviación estándar, se evaluó la distribución mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se comparó la distribución de edad entre los grupos utilizando la prueba de T de Student pareada. Las variables cualitativas se expresan como frecuencia absoluta y porcentaje.

**Figura 7. Puntajes en escalas Rankin, NIHSS, Barthel y Lovett de los 9 pacientes a lo largo de las 3 evaluaciones**



Se muestran los puntajes individuales de las escalas Rankin modificada, NIHSS, índice de Barthel y escala de Lovett en los 9 pacientes post-ictus isquémico evaluados antes del inicio de la rehabilitación integral, al mes de seguimiento y a los 3 meses en gráficos de cascada. Cada trayectoria representa la evolución clínica de un paciente a lo largo del tiempo. Escala modificada de Rankin 0-6 donde 0 es independencia funcional y 6 es muerte. NIHSS escala de deterioro cognitivo que va de 0 a 42 donde 0 es sin deterioro cognitivo y 42 es mayor déficit neurológico. Escala de Barthel, escala de independencia funcional de 0 a 100 donde 0 es dependencia total y 100 independencia funcional. Escala de Lovett, escala de fuerza muscular de 0 a 5 donde 0 es inmovilidad en la extremidad y 5 es movilidad y fuerza normal

**Figura 8. Índice de respuesta global de los 9 pacientes**

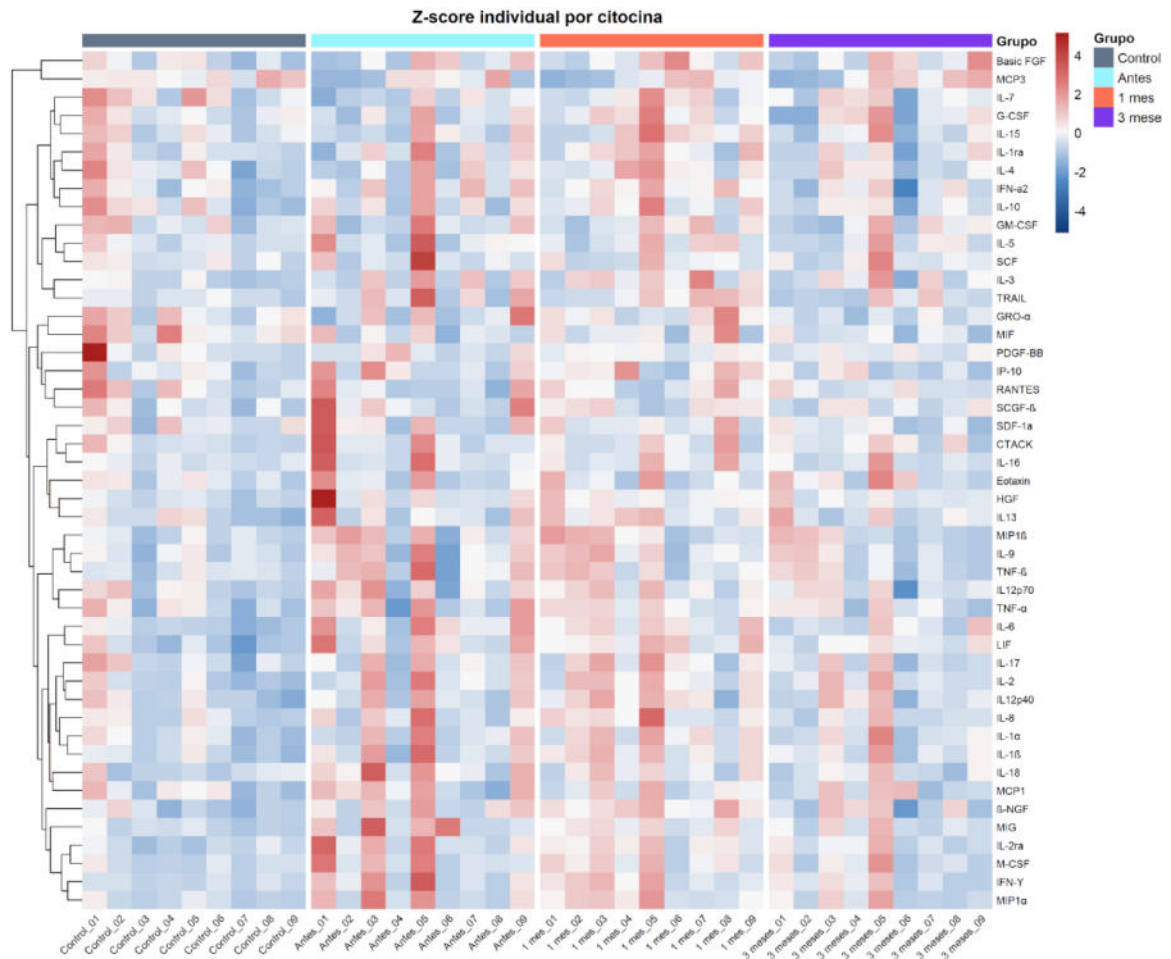


Se muestra la fórmula empleada para el cálculo del IRG así como su representación mediante un gráfico tipo spaghetti plot. Cada línea corresponde a un paciente individual y muestra la evolución de su IRG en los tres tiempos de evaluación: antes del inicio de la rehabilitación integral, al mes de seguimiento y a los 3 meses.

#### **7.2.4 Determinación de la concentración de citocinas antes del inicio de la terapia integral, al mes de su inicio y 3 meses posteriores.**

Se determinó la concentración de citocinas en muestras de plasma a través del ensayo de BioRad: Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex. Se obtuvo la concentración de cada muestra individual y se realizaron las comparaciones entre los tiempos respecto a la rehabilitación y una cohorte control, las concentraciones se graficaron de manera visual en un mapa de calor (Figura 9).

**Figura 9. Mapa de calor citocinas durante un esquema de rehabilitación integral.**



Se muestra la concentración plasmática de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento cuantificadas mediante el panel Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel 48-Plex en pacientes post-ictus isquémico evaluados antes del inicio de la rehabilitación integral, al mes y a los 3 meses de seguimiento, junto con la cohorte control pareada. Cada columna representa una muestra individual y cada fila corresponde a un analito evaluado. La intensidad del color representa la concentración relativa de cada biomarcador, permitiendo visualizar patrones globales de expresión inflamatoria durante el seguimiento.

### 7.2.5 Alteraciones del perfil de citocinas antes y durante la rehabilitación integral en comparación con controles.

En el análisis comparativo frente a la cohorte control, se identificaron diferencias en múltiples citocinas y factores de crecimiento en los distintos puntos de seguimiento. Antes del inicio de la rehabilitación, los pacientes post-ictus presentaron concentraciones significativamente mayores de LIF, HGF, MIG y MIP-1 $\beta$  respecto a la cohorte control.

**Tabla 6. Comparación basal de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento entre pacientes post-ictus isquémico y controles sanos.**

CITOCINAS	VALOR DE P	ANTES DEL I. DE LA REHAB. MEDIA $\pm$ DE MEDIANA (RIQ)	CONTROL MEDIA $\pm$ DE MEDIANA (RIQ)	FDR
LIF	0.0026	29.97 $\pm$ 6.79	23.21 $\pm$ 4.8	0.123
HGF	0.0273	128.37 (50.20)	79.17 (20.85)	0.2903
MIG	0.0234	219.6 $\pm$ 107.49	131.94 $\pm$ 34.19	0.2903
MIP1 $\beta$	0.0245	55.97 $\pm$ 20.28	39.09 $\pm$ 7.33	0.2903

Se muestran los biomarcadores plasmáticos que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes post-ictus isquémico antes del inicio de la rehabilitación integral y sus controles pareados. Las concentraciones se expresan como media  $\pm$  desviación estándar

o mediana y rango intercuartílico, de acuerdo con la distribución de cada variable. La normalidad fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre pacientes y controles pareados se utilizó la prueba *t* pareada o, la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, según correspondiera. El valor de *p* corresponde a la comparación entre grupos y el FDR representa el ajuste por comparaciones múltiples.

Al mes de seguimiento, el número de analitos con diferencias respecto a controles fue mayor, incluyendo citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores asociados a crecimiento y señalización inmunológica, lo que refleja una expansión del perfil inflamatorio detectable en este punto temporal.

**Tabla 7. Comparación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento al mes de rehabilitación entre pacientes post-ictus isquémico y controles pareados.**

<b>CITOCINA</b>	<b>VALOR DE P</b>	<b>1 MES DE REHABILITACIÓN MEDIA ± DE o MEDIANA (RIQ)</b>	<b>DE CONTROL MEDIA ± DE o MEDIANA (RIQ)</b>	<b>FDR</b>
<b>IL13</b>	<b>0.0013</b>	2.48 ± 0.47	1.91 ± 0.58	<b>0.0278</b>
<b>HGF</b>	<b>0.0018</b>	111.50 ± 22.41	79.17 ± 15.38	<b>0.0278</b>
<b>LIF</b>	<b>0.0047</b>	30.10 ± 3.81	23.21 ± 4.80	<b>0.0439</b>
<b>β-NGF</b>	<b>0.0074</b>	0.87 ± 0.15	0.59 ± 0.15	0.0579
<b>MIG</b>	<b>0.0011</b>	197.46 ± 41.11	131.94 ± 34.19	<b>0.0278</b>
<b>MIP1α</b>	<b>0.0096</b>	0.68 ± 0.14	0.52 ± 0.07	0.0612
<b>IL-8</b>	<b>0.0117</b>	4.5 ± 1.36	3.41 ± 1.23	0.0612

<b>IL-6</b>	<b>0.0148</b>	2.48 ± 0.64	1.49 ± 0.52	0.0697
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>0.0203</b>	15.78 ± 4.52	10.84 ± 1.11	0.0866
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>0.0037</b>	1.98 ± 0.42	1.36 ± 0.32	<b>0.0437</b>
<b>IL-3</b>	<b>0.0471</b>	0.65 ± 0.21	0.42 ± 0.10	0.1701
<b>M-CSF</b>	<b>0.0243</b>	7.72 ± 3.23	4.37 ± 1.58	0.0951

Se muestran los biomarcadores plasmáticos que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes post-ictus isquémico al mes de iniciado el esquema de rehabilitación integral y sus controles pareados. Las concentraciones se expresan como media  $\pm$  desviación estándar o mediana y rango intercuartílico, de acuerdo con la distribución de cada variable. La normalidad fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre pacientes y controles pareados se utilizó la prueba *t* pareada o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, según correspondiera. El valor de *p* corresponde a la comparación entre grupos y el FDR representa el ajuste por comparaciones múltiples.

En contraste, a los 3 meses de seguimiento, el número de citocinas con cambio fue menor, con persistencia de algunos mediadores como LIF, HGF y MIG/CXCL9, e incluso se identificó una disminución en los valores de MIF, una citocina proinflamatoria.

**Tabla 8. Comparación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento a los 3 meses de rehabilitación entre pacientes post-ictus isquémico y controles pareados.**

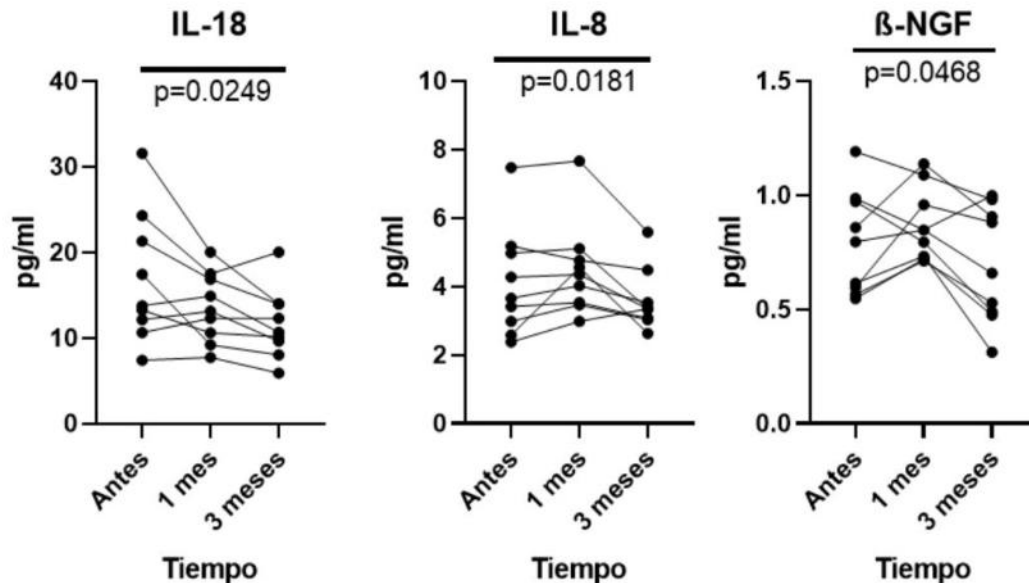
<b>CITOCINAS</b>	<b>VALOR DE P</b>	<b>3 MESES DE REHAB. MEDIA ± DE o MEDIANA (RIQ)</b>	<b>DE CONTROL MEDIA ± DE o MEDIANA (RIQ)</b>	<b>FDR</b>
<b>MIF</b>	<b>0.0194</b>	51.15 ± 19.64	91.12 ± 43.77	0.4877
<b>LIF</b>	<b>0.0461</b>	27.41 ± 2.38	23.21 ± 4.80	0.5421
<b>HGF</b>	<b>0.0208</b>	98.59 ± 22.68	79.17 ± 15.38	0.4877
<b>MIG</b>	<b>0.0311</b>	169.08 ± 60.67	131.94 ± 34.19	0.4877

Se muestran los biomarcadores plasmáticos que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes post-ictus isquémico a los tres meses de iniciado el esquema de rehabilitación integral y sus controles pareados. Las concentraciones se expresan como media ± desviación estándar o mediana y rango intercuartílico, de acuerdo con la distribución de cada variable. La normalidad fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre pacientes y controles pareados se utilizó la prueba *t* pareada o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, según correspondiera. El valor de p corresponde a la comparación entre grupos y el FDR representa el ajuste por comparaciones múltiples.

### 7.2.6 Análisis longitudinal de citocinas en pacientes post-ictus sometidos a rehabilitación integral:

El análisis longitudinal mediante la prueba de medidas repetidas permitió identificar un subconjunto de citocinas con variación significativa a lo largo del tiempo, destacando IL-8, IL-18 y  $\beta$ -NGF como mediadores con comportamiento dinámico durante el seguimiento. Estos cambios reflejan cambios progresivos del perfil inflamatorio durante la rehabilitación.

**Figura 10. Comportamiento longitudinal de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento durante la rehabilitación integral post-ictus isquémico.**



Se muestra la evolución de los biomarcadores plasmáticos cuantificados en pacientes post-ictus isquémico antes del inicio de la rehabilitación integral, al mes y a los 3 meses de seguimiento. Cada punto representa una medición individual y las líneas conectan las determinaciones correspondientes al mismo paciente a lo largo del tiempo. La normalidad fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre tiempos fueron analizadas mediante ANOVA de medidas repetidas o la prueba de Friedman. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## **7.3 Determinación de la expresión relativa de microRNAs durante un esquema de rehabilitación integral**

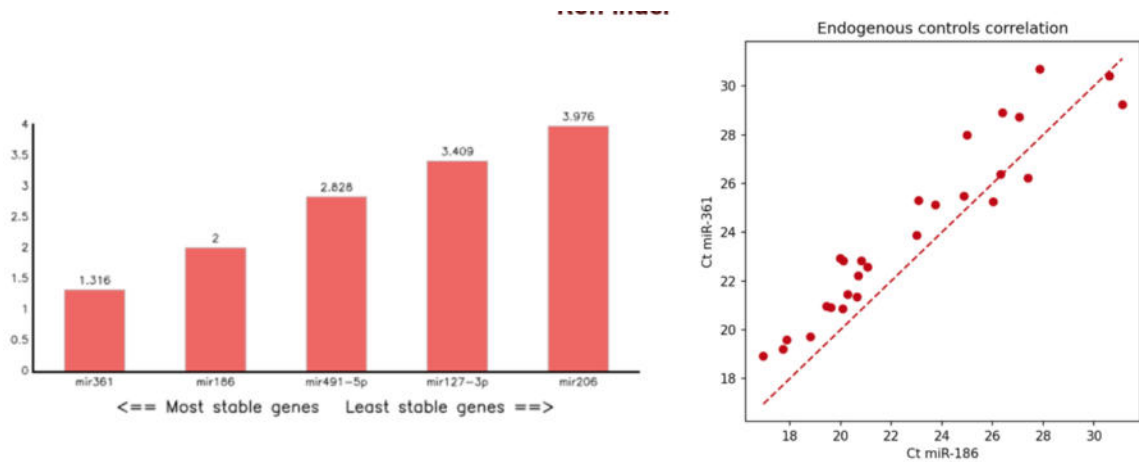
### **7.3.1 Estabilidad de microARNs**

Para la determinación de la expresión relativa de microARNs de interés, se evaluó la estabilidad de posibles controles endógenos con el objetivo de seleccionar referencias adecuadas para la normalización de los datos de RT-qPCR. Para ello, se analizó la expresión de miR-361-5p y miR-186-5p mediante la herramienta RefFinder, la cual integra distintos algoritmos de evaluación de estabilidad (geNorm, NormFinder, BestKeeper y  $\Delta\text{Ct}$ ).

Ambos microARNs mostraron una alta estabilidad de expresión a lo largo de las muestras analizadas, posicionándose entre los controles endógenos más consistentes de la cohorte. Adicionalmente, se observó una fuerte correlación entre los valores de expresión de miR-361-5p y miR-186-5p, lo que respalda su comportamiento concordante y su idoneidad como referencias internas.

Con base en estos resultados, se utilizaron ambos microARNs de manera concomitante para la normalización de la expresión relativa de los microARNs de interés mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , con el fin de reducir la variabilidad técnica y mejorar la robustez de los análisis longitudinales.

**Figura 11. Estabilidad y correlación de los microARNs endógenos utilizados para la normalización de la expresión relativa.**



Se muestra la evaluación de estabilidad de los microARNs endógenos miR-361-5p y miR-186-5p, seleccionados como controles de referencia para la normalización de la expresión relativa de microARNs circulantes en plasma. La estabilidad fue valorada mediante RefFinder, integrando los algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método  $\Delta\text{Ct}$  comparativo. Además, se presenta la correlación entre ambos controles endógenos, cuyo comportamiento concordante respalda su uso conjunto para el cálculo de la expresión relativa mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

### **7.3.2 Expresión relativa de microARNs circulantes durante la rehabilitación**

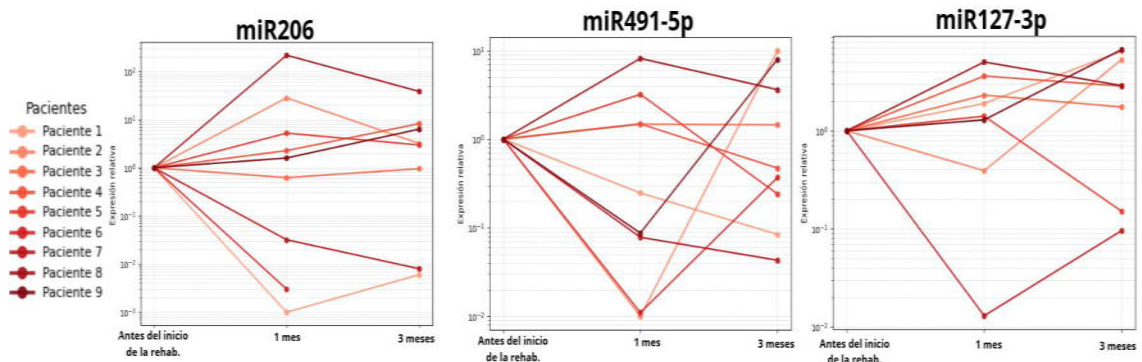
La expresión relativa de microARNs circulantes se evaluó de manera longitudinal en los pacientes post-ictus en los distintos puntos de seguimiento, utilizando como condición de referencia sus valores de expresión en plasma antes del inicio de la rehabilitación integral, con el fin de observar los cambios en la expresión inducidos por la recuperación y la rehabilitación integral. En el análisis individual, se observó un comportamiento heterogéneo entre pacientes para los microARNs evaluados, sin una cinética uniforme a nivel de cohorte.

Específicamente, miR-206 mostró un patrón dicotómico, en el cual un subgrupo de pacientes presentó un incremento en su expresión relativa posterior al inicio de la rehabilitación, mientras que otro subgrupo evidenció una disminución en los mismos puntos de seguimiento. Este comportamiento sugiere

la existencia de dos condiciones o desenlaces distintos en los pacientes, que no son capturadas por un análisis basado únicamente en promedios grupales.

En contraste, miR-127-3p y miR-491-5p mostraron patrones altamente variables entre individuos, sin una tendencia consistente de incremento o disminución a lo largo del tiempo. Esta heterogeneidad limita la identificación de una cinética temporal clara a nivel poblacional y sugiere que la regulación de estos microARNs podría estar influenciada por factores individuales o contextuales no homogéneos dentro de la cohorte.

**Figura 12. Expresión relativa de microARNs durante un esquema de rehabilitación integral.**



Se muestra la expresión relativa de los microARNs evaluados en plasma de pacientes post-ictus isquémico durante los tres tiempos de seguimiento: antes del inicio de la rehabilitación integral, al mes y a los 3 meses. La expresión relativa fue calculada mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando miR-361-5p y miR-186-5p como controles endógenos concomitantes. Cada punto representa una medición individual y las líneas permiten visualizar el comportamiento longitudinal de cada paciente.

#### **7.4 Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante la rehabilitación integral**

Con el objetivo de explorar la relación entre los cambios biológicos y la evolución clínica, se realizaron análisis de correlación entre las variaciones longitudinales ( $\Delta$ ) en las concentraciones de citocinas y microARNs, y los

cambios en las escalas clínicas en dos puntos de tiempo: al primer mes y a los 3 meses de seguimiento.

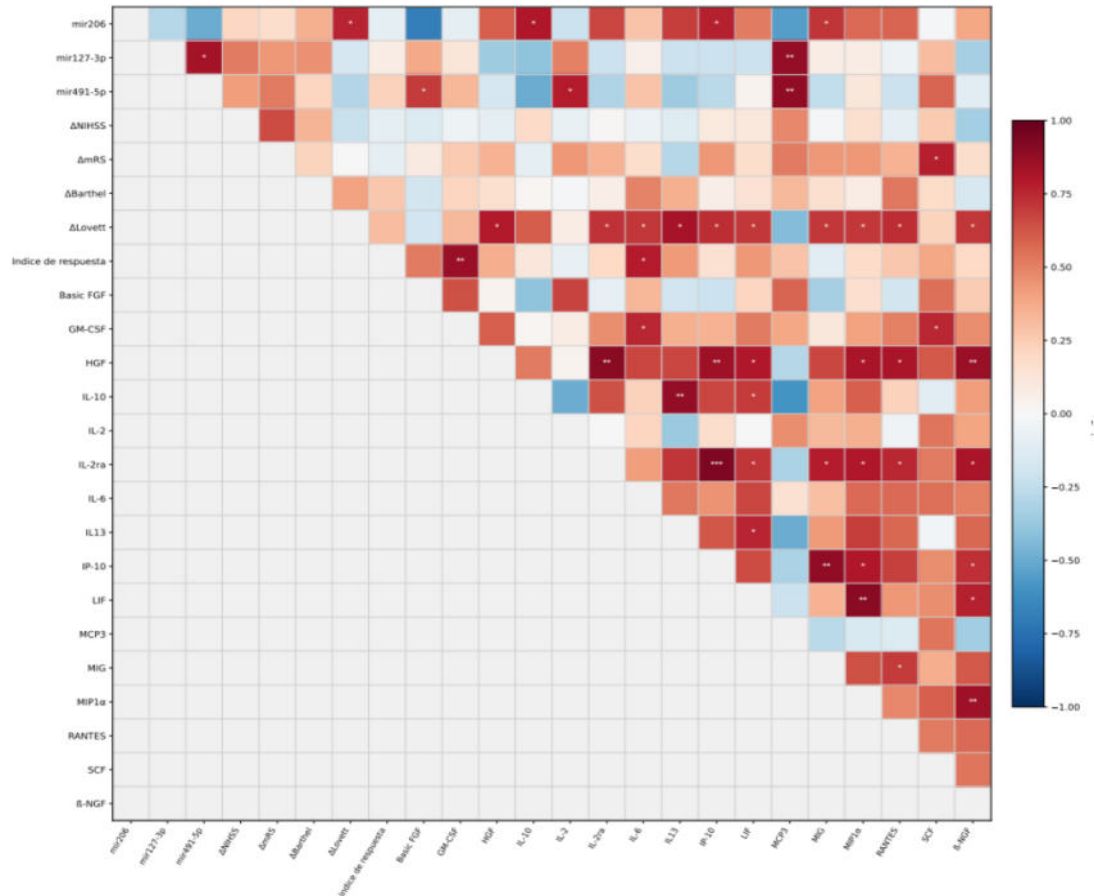
#### **7.4.1 Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el primer mes de rehabilitación integral**

En el análisis correspondiente al primer mes de tratamiento, se identificaron asociaciones significativas entre determinados biomarcadores y la magnitud de cambio en las escalas funcionales. Para la escala de discapacidad global ( $\Delta$ mRS), se observó una correlación positiva con SCF ( $r = 0.779$ ,  $p = 0.0317$ ).

En la escala motora ( $\Delta$ Lovett), se identificaron múltiples correlaciones positivas, incluyendo miR-206 ( $r = 0.759$ ,  $p = 0.0236$ ), HGF ( $r = 0.794$ ,  $p = 0.0155$ ), IL-2R $\alpha$  ( $r = 0.725$ ,  $p = 0.0331$ ) e IL-6 ( $r = 0.707$ ,  $p = 0.0407$ ), entre otros mediadores.

Por último, en el IRG se observó una correlación positiva con el factor de crecimiento GM-CSF ( $r = 0.867$ ,  $p = 0.0045$ ) y con la IL-6 ( $r = 0.783$ ,  $p = 0.0172$ ).

**Figura 13. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el primer mes de rehabilitación integral.**



Se muestran las correlaciones entre el cambio longitudinal de biomarcadores plasmáticos y microARNs circulantes con la variación de las escalas clínicas durante el primer mes de rehabilitación integral en pacientes post-ictus isquémico. Las asociaciones fueron evaluadas entre los cambios de concentración o expresión relativa de los biomarcadores y los cambios en mRS, Lovett e índice de respuesta global. La escala de color representa la magnitud y dirección del coeficiente de correlación, los tonos rojos indican correlaciones positivas, con un coeficiente de correlación ( $\rho$  de Spearman) los tonos azules indican correlaciones negativas, con coeficientes negativos y la intensidad del color refleja la fuerza de la asociación. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística de cada correlación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) y  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Las celdas sin asteriscos corresponden a correlaciones que no alcanzaron significancia estadística.

**Tabla 9. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el primer mes de rehabilitación integral.**

<b>Escala</b>	<b>Marcadores</b>
<b>ΔmRS</b>	<b>SCF</b> (r = 0.779, p = 0.0317)
<b>ΔLovett</b>	<b>mir206</b> (r = 0.759, p = 0.0236) <b>HGF</b> (r = 0.794, p = 0.0155) <b>IL-2ra</b> (r = 0.725, p = 0.0331) <b>IL-6</b> (r = 0.707, p = 0.0407) <b>IL13</b> (r = 0.822, p = 0.0185) <b>IP-10</b> (r = 0.742, p = 0.0296) <b>LIF</b> (r = 0.707, p = 0.0407) <b>MIG</b> (r = 0.707, p = 0.0407) <b>MIP1α</b> (r = 0.707, p = 0.0407) <b>RANTES</b> (r = 0.742, p = 0.0296) <b>β-NGF</b> (r = 0.707, p = 0.0407)
<b>IRG</b>	<b>GM-CSF</b> (r = 0.867, p = 0.0045) <b>IL-6</b> (r = 0.783, p = 0.0172)

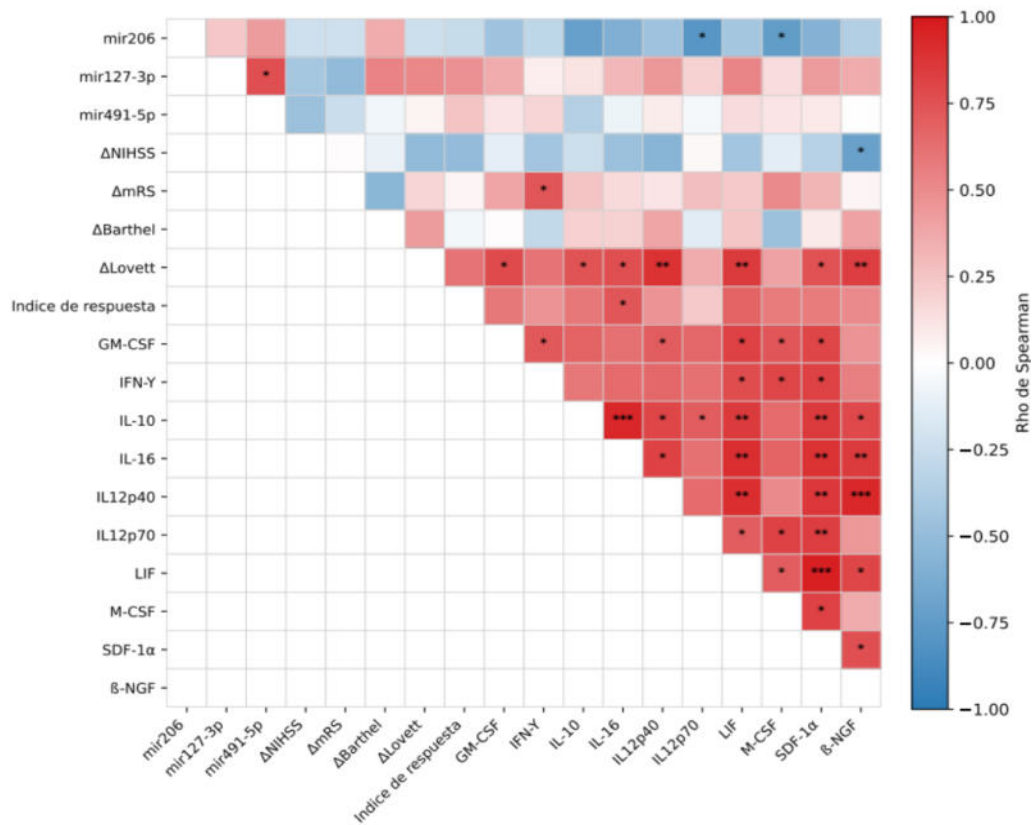
Se muestran las correlaciones significativas entre los cambios longitudinales de biomarcadores plasmáticos y microARNs circulantes con los cambios en las escalas clínicas durante el primer mes de rehabilitación integral en pacientes post-ictus isquémico. Las variables clínicas se expresan como cambio longitudinal ( $\Delta$ ) entre la medición basal y el primer mes de seguimiento. Las asociaciones fueron evaluadas mediante análisis de correlación, reportando el coeficiente de correlación ( $r$ ) y su valor de  $p$ . Se consideraron estadísticamente significativas las asociaciones con  $p < 0.05$ .

#### **7.4.2 Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos durante el tercer mes de rehabilitación integral**

En el análisis de correlaciones correspondiente a los 3 meses de seguimiento, se observó un patrón distinto al identificado en el primer mes de tratamiento. En esta etapa, el número de asociaciones significativas entre biomarcadores y cambios en las escalas clínicas fue menor, y las correlaciones identificadas mostraron una mayor dispersión entre los distintos mediadores evaluados.

A diferencia de la fase temprana, en la que múltiples citocinas y microARNs se asociaron con cambios clínicos, en el punto de 3 meses las correlaciones se concentraron en un subconjunto más limitado de biomarcadores, sin un patrón predominante claramente definido entre mediadores inflamatorios, factores de crecimiento o microARNs

**Figura 14. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos a los 3 meses de rehabilitación integral.**



Se muestran las correlaciones entre los cambios longitudinales de biomarcadores plasmáticos y microARNs circulantes con la variación de las escalas clínicas a los 3 meses de seguimiento en pacientes post-ictus isquémico sometidos a rehabilitación integral. La escala de color representa la magnitud y dirección del coeficiente de correlación: los tonos rojos indican correlaciones positivas, los tonos azules indican correlaciones negativas y la intensidad del color refleja la fuerza de la asociación. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística de cada correlación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) y  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Las celdas sin asteriscos corresponden a correlaciones que no alcanzaron significancia estadística.

**Tabla 10. Correlaciones entre biomarcadores y cambios clínicos a los 3 meses de rehabilitación integral.**

<b>Escala</b>	<b>Marcadores</b>
<b>ΔNIHSS</b>	<b>β-NGF</b> (r = -0.710, p = 0.0380)
<b>ΔmRS</b>	<b>IFN-γ</b> (r = 0.730, p = 0.0278)
<b>ΔLovett</b>	<b>GM-CSF</b> (r = 0.778, p = 0.0180) <b>IL-10</b> (r = 0.735, p = 0.0298) <b>IL-16</b> (r = 0.761, p = 0.0214) <b>IL12p40</b> (r = 0.889, p = 0.0024) <b>LIF</b> (r = 0.846, p = 0.0062) <b>SDF-1α</b> (r = 0.744, p = 0.0267) <b>β-NGF</b> (r = 0.829, p = 0.0085)
<b>IRG</b>	<b>IL-16</b> (r = 0.733, p = 0.0311)

Se muestran las correlaciones significativas entre los cambios longitudinales de biomarcadores plasmáticos y microARNs circulantes con los cambios en las escalas clínicas a los 3 meses de seguimiento en pacientes post-ictus isquémico sometidos a rehabilitación integral. Las variables clínicas se expresan como cambio longitudinal ( $\Delta$ ) entre la medición basal y los 3 meses. Las asociaciones fueron evaluadas mediante análisis de correlación, reportando el coeficiente de correlación ( $r$ ) y su valor de  $p$ . Se consideraron estadísticamente significativas las asociaciones con  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO VIII | DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó biomarcadores inflamatorios, quimiocinas, factores de crecimiento y la expresión relativa de un grupo de microARNs circulantes en pacientes post-ictus isquémico-sometidos a un esquema de rehabilitación integral. En base a lo que se sabe de la cinética descrita de la respuesta inflamatoria posterior al ictus, se esperaba observar una disminución progresiva de diversos marcadores, en particular de mediadores proinflamatorios a lo largo del seguimiento, con persistencia de algunos marcadores asociados a inflamación residual o remodelación tisular en base a trabajos similares como el de Stanne y colaboradores (84). Sin embargo, los resultados sugieren que la recuperación post-ictus no es una disminución lineal de la inflamación, es una respuesta inmunológica detectable a nivel periférico durante la rehabilitación con aumento de múltiples marcadores proinflamatorios. En particular, el aumento inflamatorio del primer mes no representa una respuesta deletérea sostenida, sino una ventana de activación inmunometabólica inducida por la rehabilitación misma, en la que el ejercicio terapéutico actúa como el principal estímulo, los biomarcadores evaluados no son marcadores de daño residual, sino lecturas periféricas de un proceso de reparación activa. Esta interpretación se desarrolla a través de los hallazgos transcriptómicos, el perfil de citocinas frente a controles, los microARNs circulantes y las correlaciones con escalas clínicas.

En el análisis *in silico*, se identificó una huella transcripcional específica del periodo subagudo, con genes que se encontraban desregulados específicamente en este periodo de tiempo, con un enriquecimiento significativo de vías relacionadas con la respuesta a quimiocinas y factores de crecimiento y además se identificó un microRNA como biomarcador candidato.

La sobreexpresión de GPX1 en los contrastes agudo y subagudo puede interpretarse como una respuesta antioxidante compensatoria frente al estrés oxidativo inducido por la isquemia. Experimentalmente, se ha demostrado que la

isquemia cerebral genera especies reactivas de oxígeno, disfunción mitocondrial y daño lipídico, fenómenos que inducen sistemas antioxidantes endógenos (85), que en este caso, podrían explicar la sobreexpresión de GPX1.

El enriquecimiento en las vías de señalización de E2F, MTOR1 y receptores de quimiocinas con sus ligandos concuerda con una respuesta que pasa de ser proinflamatoria hacia una etapa pro-resolutiva. En particular la vía E2F puede interpretarse como un marcador de activación de programas de ciclo celular, proliferación, reparación del DNA y recambio celular, lo cual podría estar asociada con una mayor representación de linfocitos activados en sangre periférica durante esta fase (86).

La vía de mTORC funciona como un sensor metabólico central que integra disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento, estrés celular y activación del sistema inmune (87). En células inmunes, mTOR regula diferenciación de linfocitos T, activación de monocitos/macrófagos, producción de citocinas, metabolismo inflamatorio y transición entre fenotipos efectores y reguladores (88), por lo que su sobrerrepresentación a la semana en ictus isquémico podría ser indicativo de presencia de linfocitos y macrófagos activados.

En el ictus isquémico, la expresión de quimiocinas aumenta después del daño cerebral como consecuencia de la activación de microglía, astrocitos, endotelio y células infiltrantes. Estas moléculas facilitan la adhesión leucocitaria, la extravasación y la comunicación entre las células en circulación, el endotelio y el parénquima cerebral lesionado. Por ello, el enriquecimiento de vías de quimiocinas en el análisis *in silico* concuerda con la fisiopatología del ictus y con la hipótesis de que la inflamación sistémica participa en la evolución funcional posterior al evento (89).

Esta interpretación es congruente con la literatura actual, que reconoce que la inflamación posterior al ictus tiene funciones duales. Revisiones recientes

han señalado que todavía existen pocos estudios que integren biomarcadores sanguíneos con desenlaces funcionales durante rehabilitación, por lo que la evaluación de los mismos en el presente trabajo se ubica dentro de un área con necesidad clara de evidencia longitudinal (78).

La identificación de miR-206 como un microARN diferencialmente expresado en más de un dataset de pacientes post-ictus sugiere que este microARN podría formar parte de una expresión diferencial reproducible asociada al ictus isquémico y que además podría estar implicado con la recuperación. A diferencia de un hallazgo aislado en una sola cohorte, la detección de miR-206 en múltiples conjuntos de datos incrementa su relevancia como biomarcador candidato, ya que apunta a una alteración conservada entre estudios independientes. Mediante miRWalk, se identificaron múltiples genes potencialmente regulados por este microARN, donde los genes diana que podrían estar implicados en la recuperación post ictus son BDNF y NFAT5.

BDNF es un factor neurotrófico que participa en la supervivencia neuronal, crecimiento axonal, plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo y reorganización de circuitos motores (90). En pacientes post-ictus, estos procesos son necesarios para lograr la recuperación funcional, y se ha demostrado en contextos experimentales la capacidad de miR206 para regular su expresión, ya que miR-206 puede unirse a la región 3'UTR de BDNF y reducir su expresión efecto que, al inhibir miR-206 se pierde, causando un aumento de los niveles de BDNF (91,92).

Por su parte, NFAT5 es un factor de transcripción sensible a estrés osmótico, hipoxia, inflamación y cambios metabólicos celulares (93). NFAT5 ha sido descrito en células del sistema nervioso y del sistema inmune, y puede participar en respuestas adaptativas frente a estrés celular (92). En el ictus isquémico, el microambiente post-isquémico se caracteriza por hipoxia, edema, estrés oxidativo, inflamación y alteración de la barrera hematoencefálica,

condiciones que pueden activar programas dependientes de NFAT5 (92). Al ser NFAT5 un blanco de miR-206 sugiere una conexión potencial entre miR-206 y la regulación de neuroinflamación que además podría participar en la contención de respuestas inflamatorias dependientes de microglía o células inmunes periféricas.

Con estas implicaciones, el potencial de miR206 como un biomarcador de recuperación post-ictus, además, clínicamente ya se ha determinado que tiene potencial como biomarcador en el contexto de ictus, He et al. midieron miR-206 en plasma de 94 pacientes con ictus isquémico agudo a las 24 horas posteriores a trombólisis con o sin tratamiento endovascular, y encontraron que sus niveles se correlacionaron con la severidad neurológica medida por NIHSS y con el volumen del infarto, aunque no se asociaron de forma independiente con desenlace funcional desfavorable ni con hemorragia intracraneal; por tanto, lo propusieron más como marcador de severidad inicial que como predictor pronóstico aislado (94), y en base a los resultados *in silico*, se propone miR206 como un biomarcador de recuperación durante la fase subaguda y durante la rehabilitación.

A través de la cuantificación de citocinas en distintos puntos de la rehabilitación se identificó una posible firma de citocinas elevadas durante el esquema de rehabilitación integral, con implicaciones en la fase de inicio de la rehabilitación como principal estímulo inmunogénico de esta respuesta.

Al inicio del seguimiento, antes de comenzar formalmente la intervención, se encontraron aumentados LIF, HGF, MIG/CXCL9 y MIP-1 $\beta$ /CCL4 frente a controles. Al mes de rehabilitación, el número de analitos elevados fue mayor e incluyó IL-13, HGF, LIF,  $\beta$ -NGF, MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, IL-8/CXCL8, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-3 y M-CSF. A los tres meses, el perfil diferencial fue más restringido, con persistencia de LIF, HGF y MIG/CXCL9, mientras que MIF fue el

único mediador que mostró concentraciones menores que las observadas en la cohorte control.

La elevación de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$  indica un aumento de señales inflamatorias innatas y tipo Th1 durante la rehabilitación. De acuerdo con la cinética clásica descrita en modelos experimentales y en estudios clínicos tempranos, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$  suelen elevarse durante la fase aguda del ictus y posteriormente deberían disminuir conforme se resuelve la respuesta inflamatoria inicial (95). Un posible mecanismo que explique el aumento de estas citocinas durante el primer mes de rehabilitación es debido al incremento en la actividad física por la rehabilitación (96,97).

El inicio del programa de rehabilitación integral y la recuperación progresiva de la movilidad de los pacientes hace que la medición en el punto de un mes represente un periodo en el que los pacientes ya han sido expuestos de forma repetida a sesiones de ejercicio terapéutico, reentrenamiento motor y contracción muscular activa, el aumento de estas citocinas podría tratarse de una respuesta inmunológica inducida por rehabilitación (97)

En el caso de IL-6, que es una de las miocinas mejor caracterizada, esta se libera por el músculo en contracción hacia la circulación, y su magnitud depende de la intensidad y la duración (96,98). A diferencia de la IL-6 producida en inflamación sistémica, la IL-6 inducida por ejercicio tiene funciones metabólicas y reguladoras al favorecer la movilización de fuentes de energía, a través de lipólisis y modificar la sensibilidad a la insulina, además de inducir mediadores antiinflamatorios como IL-10 e IL-1RA para la remodelación tisular (97), por lo que podría estar relacionada con el aumento en la actividad física en la vida diaria de los sujetos durante y después, de su intervención con rehabilitación integral.

De la misma manera, el aumento de IL-8/CXCL8 es una respuesta de remodelación que puede ser inducida por ejercicio. IL-8 es una quimiocina con capacidad para reclutar neutrófilos y amplificar respuestas inflamatorias; sin embargo, en músculo esquelético también se ha descrito que el ejercicio induce la expresión de IL-8 y de su receptor CXCR2, y puede participar en angiogénesis y adaptación vascular (99).

Ahora bien, no todo el perfil se explica por ejercicio: la elevación de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  indica que, junto con la respuesta muscular e inmunometabólica, persiste un componente genuino de activación inmune innata y adaptativa durante la fase subaguda. IL-1 $\beta$  se ha relacionado con activación inflamatoria post-ictus, daño tisular y señalización dependiente de inflammasoma, mientras que IFN- $\gamma$  se asocia con activación de linfocitos T y células NK. La persistencia de MIG/CXCL9 en los tres tiempos apoya esta observación, ya que CXCL9 es inducida por IFN- $\gamma$  y participa en el reclutamiento de células CXCR3+ (95).

Estos hallazgos permiten proponer que el aumento de citocinas proinflamatorias al mes de rehabilitación no necesariamente representa una respuesta inflamatoria sostenida, más bien, podría tratarse de una ventana de activación inmunológica inducida por la rehabilitación integral, sin embargo, al no contar con un grupo control sin rehabilitación, esta suposición es una hipótesis por contrastar en futuros protocolos de investigación.

Por otro lado, el hallazgo de la disminución de MIF a los tres meses de seguimiento nos orienta hacia un posible biomarcador de recuperación en la integridad de la barrera hematoencefálica. MIF, o factor inhibidor de la migración de macrófagos, es una citocina pleiotrópica con funciones proinflamatorias, quimiotácticas y vasculares (100,101). En el ictus isquémico se ha descrito que sus concentraciones séricas aumentan durante la fase aguda y se asocian con mayor volumen del infarto, mayor severidad neurológica medida por NIHSS y

peor desenlace funcional a largo plazo, por lo que ha sido propuesto como un biomarcador de severidad y pronóstico en el ictus isquémico agudo (100,101).

La relevancia de MIF radica en su capacidad para modular la integridad de la barrera hematoencefálica. Liu et al. demostraron que MIF incrementa la permeabilidad de la BHE en modelos experimentales de isquemia/reperfusión, acompañado de disminución de proteínas de uniones estrechas como claudina-5, ZO-1 y ocludina (101). En el mismo estudio, el antagonismo farmacológico de MIF con ISO-1 redujo la extravasación de azul de Evans, lo que sugiere que MIF participa activamente en la disrupción de la barrera y no sólo refleja inflamación sistémica secundaria (101). Por lo que, al observar una disminución, se puede inferir sobre la restauración de la permeabilidad, o más bien, impermeabilidad de la barrera hematoencefálica restaurada tras 3 meses de rehabilitación integral, sin embargo, esta es una inferencia teórica, ya que solamente la disminución de una molécula asociada en comparación contra una cohorte control, no es suficiente evidencia para atribuir que ha sido restaurada por completo la barrera sin evidencia por imagen o histología de esta.

Además, MIF en fases posteriores ejerce efectos neuroprotectores al inhibir la apoptosis neuronal, inducir la expresión de BDNF e inhibir la activación de caspasa-3 (102). En este contexto, la disminución de MIF circulante observada al tercer mes podría interpretarse como un indicador de resolución de la respuesta inflamatoria inicial y de transición hacia un microambiente sistémico más permisivo para la reparación tisular. Alternativamente, dado el tamaño muestral reducido y la ausencia de corrección por múltiples comparaciones, este hallazgo debe considerarse exploratorio y replicarse en cohortes más amplias con puntos de tiempo más tempranos que permitan capturar la cinética completa de MIF desde la fase aguda hasta la subaguda tardía.

En este estudio se utilizaron miR-361-5p y miR-186-5p como controles endógenos concomitantes. Su selección se fundamentó en que ambos han sido

utilizados previamente como referencias internas en estudios de microARNs circulantes asociados a ejercicio, actividad física o entrenamiento, contextos fisiológicos relevantes para este trabajo, dado que la rehabilitación integral post-ictus implica exposición repetida a estímulos motores, contracción muscular y adaptación metabólica. Para este estudio se emplearon miR-186-5p y miR-361-5p como controles endógenos concomitantes para el cálculo de expresión relativa mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La elección inicial de estos microARNs se fundamentó en el trabajo de D'Souza et al., quienes evaluaron un panel amplio de microARNs en músculo esquelético y circulación en respuesta a ejercicio de resistencia agudo (103), incluyendo dentro de los microARNs analizados a miR-186-5p y miR-361-5p. Al evaluar su estabilidad a través de la plataforma RefFinder (104), herramienta que integra algoritmos como geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método comparativo  $\Delta Ct$  para jerarquizar genes o microARNs candidatos de referencia, miR-186-5p y miR-361-5p mostraron alta estabilidad a lo largo de las muestras, además de una correlación fuerte entre ambas.

Aunque en este estudio no se utilizó un control exógeno tipo spike-in, como cel-miR-39, el empleo simultáneo de dos controles endógenos estables reduce la dependencia de una sola referencia y fortalece el análisis longitudinal. No obstante, esta limitación debe reconocerse, ya que un spike-in habría permitido estimar variabilidad asociada a extracción, retrotranscripción y amplificación (105). Aun así, la estabilidad observada de miR-186-5p y miR-361-5p mediante RefFinder apoya su uso como normalizadores internos para interpretar la expresión relativa de los microARNs plasmáticos evaluados en este estudio.

La evaluación longitudinal de microARNs plasmáticos mostró un comportamiento heterogéneo entre pacientes, sin una cinética uniforme a nivel grupal. Este hallazgo es esperable en una cohorte post-ictus sometida a rehabilitación, ya que los microARNs circulantes pueden reflejar simultáneamente procesos de daño cerebral residual, activación inmune periférica, remodelación vascular, adaptación muscular, actividad plaquetaria y

respuesta individual al estímulo terapéutico, demostrando ser posibles indicadores de trayectorias biológicas individuales durante la recuperación más que un marcador de un proceso lineal.

Entre los microARNs evaluados, miR-206 mostró un comportamiento aparentemente dicotómico, donde la expresión aumentaba después de la rehabilitación en algunos pacientes y en otros disminuye, este comportamiento puede deberse a la misma actividad física que realiza el paciente, no solo durante la rehabilitación, sino también por su recuperación, como se observó en las escalas, los pacientes tuvieron un aumento considerable de su fuerza muscular a lo largo del tiempo, y tradicionalmente, mir206 es considerando un myomir, un grupo de microARNs que se liberan a circulación por la contracción muscular y están implicados en la remodelación del músculo (106).

Además, su capacidad de regular la expresión del factor neurotrófico BDNF, que se considera un factor de crecimiento necesario para la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal y la recuperación post-ictus (90), hace que su evaluación y correlación con escalas clínicas sea un miARN con posibles implicaciones pronósticas. Esta propuesta debe conciliarse con una aparente contradicción en la literatura. He et al. reportaron que miR-206 plasmático a las 24 horas del ictus se correlaciona con mayor severidad (NIHSS) y volumen de infarto (94), y Song et al. lo asociaron con mayor riesgo de transformación hemorrágica (110); es decir, en la fase aguda miR-206 elevado parece un marcador de daño, no de recuperación. La discrepancia con nuestra interpretación se resuelve al considerar la ventana temporal y el origen del transcrito. En la fase hiperaguda, el miR-206 circulante probablemente refleja liberación por daño tisular y disrupción de la barrera hematoencefálica, contexto en el que correlaciona con severidad. En la fase subaguda y durante la rehabilitación, el escenario de este estudio, la fuente dominante del miR-206 circulante podría ser otra. Al ser un myomir liberado por la contracción del músculo esquelético (106), su elevación traza la actividad física del paciente más

que el daño cerebral. Así, el mismo microARN puede comportarse como marcador de severidad en la fase aguda y como lectura de actividad muscular y, por extensión, de participación en la rehabilitación en la fase subaguda, sin que ambas observaciones sean incompatibles. Esta dualidad refuerza, no debilita, la necesidad de interpretar miR-206 siempre en su ventana temporal.

Por otro lado, miR-127-3p puede discutirse principalmente desde su papel en inflamación y polarización de macrófagos. Estudios experimentales han mostrado que miR-127 favorece un fenotipo de macrófagos proinflamatorio mediante regulación de BCL6 y activación de la vía JNK, incrementando la producción de citocinas inflamatorias (107). En modelos de daño hipóxico-isquémico neonatal, miR-127-3p también se ha relacionado con regulación de autofagia mediante C1SD1, lo que sugiere que puede participar en respuestas celulares frente a hipoxia y estrés metabólico (108). Más recientemente, se ha descrito que el eje miR-127-3p/Akt3 puede participar en lesión neuronal inducida por OGD/R, inflamación, estrés oxidativo y apoptosis (109). Sin embargo, en estos resultados, miR-127-3p no mostró una tendencia uniforme de incremento o disminución durante el seguimiento, lo que limita su interpretación como marcador longitudinal útil en este contexto.

De manera similar, miR-491-5p tiene reportes de asociación con desenlaces clínicos en ictus y con procesos de remodelación vascular. Song et al. reportaron que niveles séricos más altos de miR-491-5p se asociaron de manera independiente con menor riesgo de mal desenlace funcional al año en pacientes con ictus isquémico agudo (110). En el mismo estudio, mientras miR-206 se relacionó con mayor riesgo de transformación hemorrágica, miR-491-5p pareció tener una asociación más favorable con pronóstico funcional (110). Otros trabajos sobre perfiles de microARNs plasmáticos durante el primer mes posterior al ictus han señalado que los microARNs cambian en oleadas temporales durante la transición de lesión a reparación, lo que respalda la idea de que ciertos microARNs pueden participar en ventanas específicas de reparación neural,

remodelación vascular o inflamación secundaria (111), pero, al igual que miR127-3p, también miR-491-5p mostró variabilidad interindividual sin una cinética clara.

Antes de interpretar las correlaciones entre biomarcadores y escalas, es necesario aclarar que, a pesar de que varios de los mediadores se asociaron con mejoría, muchos de ellos son inducibles por la actividad física, y los pacientes con mayor capacidad funcional residual podrían participar con mayor intensidad en el programa de rehabilitación, Esto puede ser un factor de confusión , ya que la correlación entre biomarcador y recuperación podría no reflejar un papel biológico del mediador en la reparación, sino de la “dosis” real de ejercicio que mueve a ambos a la vez. Este estudio no midió ni controló la intensidad individual de participación, por lo que esta confusión no puede descartarse y obliga a interpretar todas las asociaciones siguientes como señales candidatas, no como evidencia de causalidad. Dicho esto, el patrón de correlaciones tiene una coherencia vale la pena detallar.

Durante el primer mes de rehabilitación, el cambio en Lovett se correlacionó positivamente con miR-206, HGF, IL-2R $\alpha$ , IL-6, IL-13, IP-10/CXCL10, LIF, MIG/CXCL9, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5 y  $\beta$ -NGF. Esto sugiere que la mejoría motora se acompaña de un aumento de distintos mediadores que incluyen mediadores inflamatorios, quimiocinas y factores neurotróficos.

Estas asociaciones podrían reflejar una fase de alta actividad inmunometabólica inducida por el inicio de la rehabilitación, en particular la correlación de IL-6 con  $\Delta$ Lovett y con el índice de respuesta global, ya que IL-6 puede comportarse como una miocina liberada por músculo esquelético durante la contracción y participar en adaptación metabólica e inmunomodulación inducida por ejercicio y la actividad física (98).

Dentro de los factores de crecimiento, los cambios al primer mes de rehabilitación, la correlación de HGF y LIF con mejoría motora temprana es una asociación esperada. HGF es un factor de crecimiento que tiene funciones angiogénicas y neurotróficas, funciones reportadas en la literatura como parte de la respuesta inflamatoria post-ictus (112), al igual que LIF, una citocina de la familia de IL-6 que participa en supervivencia de neuronas al mitigar el daño de especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, participando en limitar la extensión del daño inicial por mecanismos secundarios a la isquemia (113), un efecto que se ha demostrado experimentalmente ser efectuado por actividad mitocondrial y es dependiendo de sexo y edad (114).

La asociación entre miR-206 y  $\Delta$ Lovett al primer mes es un hallazgo esperable, al ser un myomir se espera su cambio de expresión en base a la actividad física, ya sea por la recuperación de la fuerza muscular o por la actividad física realizada durante la rehabilitación, aunque es más probable que se deba a la recuperación de la fuerza física y de la movilidad, ya que, como demostró Souza y colaboradores, su elevación es aguda después de realizar ejercicio de resistencia (103).

Las quimiocinas que correlacionaron con  $\Delta$ Lovett al primer mes sugieren procesos de migración y comunicación inmune durante la recuperación post-ictus. MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 son inducidas por IFN- $\gamma$  y se relacionan con reclutamiento de células CXCR3+ (115), mientras que RANTES/CCL5 y MIP-1 $\alpha$ /CCL3 participan en la atracción de monocitos, linfocitos y otras células inmunes (116). Este perfil puede representar una comunicación inmunológica activa entre periferia, endotelio y tejido en reparación, al tratarse principalmente de reclutamiento de monocitos y linfocitos, que podrían estar llevando a cabo la respuesta de reparación de tejidos por medio de linfocitos Treg, Th2 y macrófagos derivados de monocitos M2 (117).

A los tres meses, el patrón de correlaciones cambió. El número de asociaciones fue menor y se concentró en un grupo más selectivo de mediadores:  $\beta$ -NGF, GM-CSF, IL-10, IL-16, IL-12p40, LIF y SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, mostrando una posible transición desde una activación amplia al primer mes hacia un perfil más relacionado con reparación, observación que se respalda en la disminución de las citocinas elevadas respecto al primer mes de tratamiento y en la similitud de los perfiles de citocinas de los pacientes 3 meses después de la rehabilitación con los sujetos controles.

La correlación negativa entre  $\beta$ -NGF y  $\Delta$ NIHSS es esperable, NIHSS disminuye conforme mejora el déficit neurológico, por lo tanto, una correlación negativa puede interpretarse como que aumentos en  $\beta$ -NGF se asocian con menor déficit neurológico. Además,  $\beta$ -NGF también correlacionó positivamente con  $\Delta$ Lovett a los tres meses, mostrando su posible relación con recuperación neuromotora.

NGF ha demostrado en modelos experimentales de isquemia cerebral su participación en la recuperación funcional. Matsuda et al. demostraron que el ejercicio en caminadora iniciado después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media mejoró la conducta motora, redujo el déficit neurológico y disminuyó el volumen del infarto. Además, el ejercicio aumentó la expresión de midkine, NGF y PECAM-1, mientras redujo la expresión de caspasa-3, lo que sugiere un efecto combinado sobre neurotrofismo, angiogénesis y reducción de apoptosis neuronal (118).

Interesantemente, otros indicadores de que la mejoría de sistema inmune e inducida podría ser vista por indicadores indirectos, como la HB, que se ha reportado como marcador de recuperación post-ictus (119). En conjunto, el patrón de correlaciones es coherente con la narrativa de una inflamación regulada al servicio de la reparación. No obstante, esa coherencia no resuelve el sesgo de participación planteado al inicio de esta sección: mientras no se mida

la dosis individual de ejercicio, no es posible separar el papel biológico de cada mediador del efecto de un tercer factor que eleva biomarcadores y mejoría a la vez. Las asociaciones aquí descritas deben leerse, por tanto, como hipótesis mecánicas a contrastar, no como evidencia de causalidad.

Tomados en conjunto, los hallazgos de este trabajo explican una misma narrativa temporal. El análisis *in silico* sitúa la fase subaguda como una ventana de transición desde un perfil pro-inflamatorio y de estrés oxidativo hacia uno pro-resolutivo; el perfil de citocinas frente a controles muestra que esa transición no es un apagado silencioso, sino una reactivación periférica al iniciar la rehabilitación, con un pico al primer mes y restricción al tercero; los microARNs, como miR-206, añaden una lectura del componente muscular de esa reactivación; y las correlaciones con escalas clínicas vinculan ese repunte inmunometabólico con la mejoría motora y funcional. La rehabilitación no solo entrena al paciente, sino que introduce un estímulo inmunometabólico, contracción muscular, liberación de miocinas y myomir, que se solapa con los mecanismos endógenos de neuroreparación. El aumento de mediadores inflamatorios durante el primer mes deja de leerse como deterioro y pasa a leerse como la firma periférica de un proceso de reparación en curso. La implicación práctica es que el valor de un mismo biomarcador depende del momento en que se mide, y en el caso de ictus isquémico, donde la respuesta es dinámica, puede ser un indicador pronóstico del estado residual en el basal o respuesta al tratamiento al primer mes, lo que obliga a interpretar cualquier panel de recuperación post-ictus en clave longitudinal y no transversal. Esta lectura, no obstante, queda condicionada por las limitaciones que se discuten a continuación, en particular la ausencia de un grupo sin rehabilitación y el sesgo de participación ya señalado.

El presente estudio debe interpretarse considerando varias limitaciones metodológicas y analíticas propias de una investigación exploratoria, longitudinal y basada en biomarcadores circulantes.

En primer lugar, el tamaño de muestra fue reducido, con una cohorte de 9 pacientes post-ictus isquémico evaluados longitudinalmente. Aunque el diseño con mediciones repetidas permite observar cambios intraindividuales durante el seguimiento, el número limitado de participantes reduce la potencia estadística, incrementa la sensibilidad a valores extremos y limita la generalización de los hallazgos. Esta limitación es consistente en diversos estudios de biomarcadores en ictus, donde la heterogeneidad clínica, temporal y biológica de los pacientes puede influir de forma importante en las concentraciones circulantes de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y microARNs (77).

Por ello, los resultados deben considerarse principalmente como hallazgos exploratorios y generadores de hipótesis, más que como evidencia confirmatoria de utilidad clínica. La necesidad de validar biomarcadores de ictus en cohortes independientes y con tamaños muestrales mayores ha sido reconocida ampliamente en la literatura sobre biomarcadores neuro inflamatorios y medicina de rehabilitación post-ictus (77,120).

Una segunda limitación corresponde a la heterogeneidad clínica, tanto de la cohorte como la misma heterogeneidad inherente al ictus isquémico. Una de las principales factores que afecta la concentración de citocinas en plasma es la edad y el sexo (121,122), y si bien, el abordaje de pruebas pareadas ayuda a compensar por la variabilidad inherente de esta variable, lo ideal sería limitar la muestra a un solo sexo y un grupo de edad más cerrado. Además, aunque se incluyeron pacientes con antecedente de ictus isquémico reciente y seguimiento bajo un esquema de rehabilitación integral, variables como extensión de la lesión, localización anatómica, severidad basal, comorbilidades, tratamiento farmacológico, estado funcional previo y variabilidad en la respuesta individual a la rehabilitación pueden modificar tanto la evolución clínica como el perfil inflamatorio circulante (123). Las escalas clínicas utilizadas, como NIHSS, mRS y Barthel, son instrumentos ampliamente empleados en investigación en ictus, pero cada una captura dimensiones distintas de recuperación, discapacidad o

independencia funcional, y ninguna por sí sola resume completamente el proceso de recuperación post-ictus. Además, se ha reconocido que escalas como el índice de Barthel pueden presentar efectos de techo o piso, lo que puede limitar su sensibilidad para detectar cambios clínicos en ciertos rangos de recuperación (124).

Otra limitación importante fue el uso de plasma no pobre en plaquetas para la medición de microARNs circulantes y biomarcadores solubles. Esta condición preanalítica debe considerarse porque las plaquetas contienen microARNs y pueden liberar material molecular durante su activación, procesamiento o almacenamiento. En estudios de microARNs circulantes, se ha documentado que las condiciones de procesamiento del plasma, incluyendo centrifugación, filtración y depleción plaquetaria, pueden modificar de manera sustancial los perfiles detectados; incluso se ha reportado que una proporción considerable de microARNs medibles puede verse afectada únicamente por diferencias en el procesamiento preanalítico (125). Por tanto, los cambios observados en microARNs deben interpretarse como expresión en plasma total bajo las condiciones de procesamiento utilizadas, y no necesariamente como señal exclusiva de origen neuronal, inmunológico o vascular.

En relación con la cuantificación de microARNs por RT-qPCR, también debe reconocerse la limitación asociada a la normalización. En este estudio se utilizaron miR-361-5p y miR-186-5p como controles endógenos, evaluados posteriormente mediante RefFinder; sin embargo, en el campo de los microARNs circulantes no existe consenso universal sobre un control endógeno óptimo para todas las matrices, enfermedades o condiciones preanalíticas (105). Por ello, aunque la normalización empleada fue metodológicamente razonable, la ausencia de un control exógeno y la falta de validación externa de los controles endógenos en una cohorte independiente limitan la comparabilidad con otros estudios.

Además, el panel de 48 analitos y el análisis de varios microARNs aumentan la probabilidad de hallazgos significativos por azar, especialmente en análisis correlacionales. Aunque se reportaron valores de significancia y, cuando correspondió, ajuste por comparaciones múltiples, las correlaciones deben interpretarse con cautela debido al carácter exploratorio del estudio. En este contexto, las asociaciones entre biomarcadores y escalas clínicas no deben entenderse como evidencia de causalidad, sino como señales biológicas candidatas que requieren validación en cohortes más grandes, idealmente con modelos multivariados ajustados por severidad basal, edad, sexo, comorbilidades, tratamiento y características radiológicas del ictus.

Finalmente, el estudio no incluyó un grupo post-ictus sin rehabilitación integral ni comparación entre diferentes modalidades, intensidades o tiempos de inicio de rehabilitación. Por esta razón, no es posible atribuir de manera causal los cambios observados exclusivamente al esquema de rehabilitación. Los cambios longitudinales podrían reflejar una combinación de recuperación espontánea, evolución natural post-ictus, tratamiento médico, adaptación funcional e intervención rehabilitadora. Esta limitación se sostiene con base en la literatura actual donde se reconoce que la rehabilitación post-ictus es heterogénea y que aún se requieren biomarcadores capaces de estratificar pacientes, monitorizar respuesta y orientar intervenciones personalizadas (120).

Una siguiente fase debería incluir una cohorte multicéntrica, con mayor número de pacientes, controles pareados y, de ser posible, un grupo post-ictus con rehabilitación convencional o con diferentes intensidades terapéuticas. Esta aproximación permitiría evaluar si los biomarcadores identificados se comportan como marcadores de evolución natural, marcadores de respuesta a rehabilitación o predictores tempranos de recuperación funcional.

Una perspectiva metodológica central será mejorar la fase preanalítica del estudio, particularmente en el análisis de microARNs circulantes. En futuros

estudios se recomienda recolectar y procesar plasma pobre en plaquetas, idealmente mediante protocolos de doble centrifugación o estrategias estandarizadas de remoción plaquetaria, ya que las plaquetas contienen y liberan microARNs que pueden modificar sustancialmente el perfil circulante detectado (126).

Asimismo, se deberá fortalecer la estrategia de normalización de microARNs. Aunque en este estudio se utilizaron miR-361-5p y miR-186-5p como controles endógenos, en estudios posteriores sería recomendable incorporar normalizadores exógenos tipo *spike-in*, como cel-miR-39 u otros microARNs sintéticos no humanos, añadidos durante la extracción o antes de la retrotranscripción. Estos controles permiten monitorear la eficiencia de extracción, pérdidas técnicas, inhibición de la retrotranscripción y variabilidad entre muestras. Las guías MIQE y las recomendaciones específicas para estudios de microARNs circulantes subrayan que la estrategia de normalización debe reportarse y validarse rigurosamente, dado que constituye una de las principales fuentes de variabilidad en RT-qPCR (105,127).

Finalmente, los hallazgos deberán explorarse mediante modelos estadísticos y bioinformáticos más integrativos. Con una cohorte mayor, sería posible construir modelos longitudinales mixtos, análisis de trayectorias, reducción de dimensionalidad, redes de correlación, modelos multiómicos y algoritmos predictivos supervisados. Sin embargo, cualquier modelo predictivo deberá incluir validación interna y externa para evitar sobreajuste, especialmente cuando el número de biomarcadores excede ampliamente el número de pacientes.

## **CAPÍTULO IX | CONCLUSIÓN**

Se identificó un perfil de citocinas candidatas a biomarcadores de recuperación tras un ictus, que se elevan durante un programa de rehabilitación integral y cuyo aumento se asocia a una mejora clínica en múltiples escalas. Los resultados no apoyan la hipótesis alterna, la elevación de biomarcadores proinflamatorios y quimiocinas no se asoció con un peor desenlace funcional. Múltiples biomarcadores mostraron asociaciones positivas con la mejoría clínica, por lo que se rechaza la hipótesis alterna en dicha dirección.

## CAPÍTULO X | PERSPECTIVAS

- Ampliar el tamaño muestral en una siguiente etapa.
- Replicar los resultados en una cohorte independiente para fortalecer la validación de los biomarcadores.
- Implementar el modelo analítico multimodal de predicción del éxito terapéutico.
- Evaluar los biomarcadores en más tiempos de seguimiento para definir mejor su cinética real.
- Correlacionar con las evaluaciones neuropsicológicas de los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. King RB. Quality of life after stroke. **Stroke**. 1996;27(9):1467-72. [doi:10.1161/01.str.27.9.1467](https://doi.org/10.1161/01.str.27.9.1467).
2. GBD 2021 Stroke Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. **Lancet Neurol**. 2024;23(10):973-1003. [doi:10.1016/S1474-4422\(24\)00369-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(24)00369-7).
3. Mendelson SJ, Prabhakaran S. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack and Acute Ischemic Stroke: A Review. **JAMA**. 2021;325(11):1088-98. [doi:10.1001/jama.2020.26867](https://doi.org/10.1001/jama.2020.26867).
4. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins SO, Pandian J, Lindsay P, et al. World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025. **Int J Stroke**. 2025;20(2):132-44. [doi:10.1177/17474930241308142](https://doi.org/10.1177/17474930241308142).
5. De la Cruz-Góngora V, Chiquete E, Gómez-Dantés H, Cahuana-Hurtado L, Cantú-Brito C. Trends in the burden of stroke in Mexico: A national and subnational analysis of the global burden of disease 1990–2019. **Lancet Reg Health Am**. 2022;10:100204. [doi:10.1016/j.lana.2022.100204](https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100204).
6. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**. 2010;67(2):181-98. [doi:10.1016/j.neuron.2010.07.002](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.002).
7. Vandelanotte S, De Meyer SF. Acute Ischemic Stroke Thrombus Composition. **Neuroscience**. 2024;550:11-20. [doi:10.1016/j.neuroscience.2023.12.010](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.12.010).

8. Allen CL, Bayraktutan U. Risk factors for ischaemic stroke. **Int J Stroke**. 2008;3(2):105-16. [doi:10.1111/j.1747-4949.2008.00187.x](https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2008.00187.x).
9. Stanton K, Philippou H, Ariëns RA. Ischaemic Stroke, Thromboembolism and Clot Structure. **Neuroscience**. 2024;550:3-10. [doi:10.1016/j.neuroscience.2024.02.024](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.02.024)
10. Kato Y, Tsutsui K, Nakano S, Hayashi T, Suda S. Cardioembolic Stroke: Past Advancements, Current Challenges, and Future Directions. **Int J Mol Sci**. 2024;25(11):5777. [doi:10.3390/ijms25115777](https://doi.org/10.3390/ijms25115777).
11. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. **Stroke**. 1993;24(1):35-41. [doi:10.1161/01.str.24.1.35](https://doi.org/10.1161/01.str.24.1.35)
12. Iadecola C, Buckwalter MS, Anrather J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. **J Clin Invest**. 130(6):2777-88. [doi:10.1172/JCI135530](https://doi.org/10.1172/JCI135530).
13. Ramos-Cabrer P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. Targeting the ischemic penumbra. **Stroke**. 2011;42(1 Suppl):S7-11. [doi:10.1161/STROKEAHA.110.596684](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.596684).
14. Gauberti M, De Lizarrondo SM, Vivien D. The “inflammatory penumbra” in ischemic stroke: From clinical data to experimental evidence. **Eur Stroke J**. 2016;1(1):20-7. [doi:10.1177/2396987316630249](https://doi.org/10.1177/2396987316630249).
15. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. THE INFLAMMATORY RESPONSE IN STROKE. **J Neuroimmunol**. 2007;184(1-2):53-68.

[doi:10.1016/j.jneuroim.2006.11.014](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.014)

16. Cao Y, Yue X, Jia M, Wang J. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for ischemic stroke. **Heliyon**. 2023;9(7):e17986.

[doi:10.1016/j.heliyon.2023.e17986](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17986).

17. Chen W, Zhang Y, Zhai X, Xie L, Guo Y, Chen C, et al. Microglial phagocytosis and regulatory mechanisms after stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2022;42(9):1579-96. [doi:10.1177/0271678X221098841](https://doi.org/10.1177/0271678X221098841).

18. Zhao J, Zhang W, Wu T, Wang H, Mao J, Liu J, et al. Efferocytosis in the Central Nervous System. **Front Cell Dev Biol**. 2021;9.

[doi:10.3389/fcell.2021.773344](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.773344).

19. Liu W, Qi Z, Li W, Liang J, Zhao L, Shi Y. M1 Microglia Induced Neuronal Injury on Ischemic Stroke via Mitochondrial Crosstalk between Microglia and Neurons. **Oxid Med Cell Longev**. 2022;2022:4335272.

[doi:10.1155/2022/4335272](https://doi.org/10.1155/2022/4335272)

20. Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, et al. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. **Nat Commun**. 2016;7:11499.

[doi:10.1038/ncomms11499](https://doi.org/10.1038/ncomms11499).

21. Jin WN, Shi SXY, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ, et al. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2017;37(6):2224-36. [doi:10.1177/0271678X17694185](https://doi.org/10.1177/0271678X17694185).

22. Sapolsky RM, Pulsinelli WA. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. **Science**. 1985;229(4720):1397-400.

[doi:10.1126/science.4035356](https://doi.org/10.1126/science.4035356).

23. Norris JW. Steroid therapy in acute cerebral infarction. **Arch Neurol.** 1976;33(1):69-71. [doi:10.1001/archneur.1976.00500010071014](https://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500010071014).
24. Elkind MSV, Veltkamp R, Montaner J, Johnston SC, Singhal AB, Becker K, et al. Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): A randomized, placebo-controlled trial. **Neurology.** 2020;95(8):e1091-104. [doi:10.1212/WNL.00000000000010038](https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000010038).
25. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. **Neurology.** 2001;57(8):1428-34. [doi:10.1212/wnl.57.8.1428](https://doi.org/10.1212/wnl.57.8.1428).
26. Merali Z, Huang K, Mikulis D, Silver F, Kassner A. Evolution of blood-brain-barrier permeability after acute ischemic stroke. **PLoS One.** 2017;12(2):e0171558. [doi:10.1371/journal.pone.0171558](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171558).
27. McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. Systemic Inflammation Alters the Kinetics of Cerebrovascular Tight Junction Disruption after Experimental Stroke in Mice. **J Neurosci.** 2008;28(38):9451-62. [doi:10.1523/JNEUROSCI.2674-08.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2674-08.2008).
28. Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, et al. Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in **Stroke.** *Stroke.* 2009;40(5):1849-57. [doi:10.1161/STROKEAHA.108.534503](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.534503).
29. Gill, D., & Veltkamp, R. (2016). Dynamics of T cell responses after stroke. **Current opinion in pharmacology**, 26, 26–32. [doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.009](https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.009)

30. Zhang D, Ren J, Luo Y, He Q, Zhao R, Chang J, et al. T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights. **Front Immunol.** 2021;12. [doi:10.3389/fimmu.2021.707972](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.707972).
31. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature.** 2014;510(7503):92-101. [doi:10.1038/nature13479](https://doi.org/10.1038/nature13479).
32. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Semin Immunol.** 2015;27(3):200-15. [doi:10.1016/j.smim.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.004).
33. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **J Clin Invest.** 2018;128(7):2657-69. [doi:10.1172/JCI97943](https://doi.org/10.1172/JCI97943).
34. Benakis C, Llovera G, Liesz A. The meningeal and choroidal infiltration routes for leukocytes in stroke. **Ther Adv Neurol Disord.** 2018;11:1756286418783708. [doi:10.1177/1756286418783708](https://doi.org/10.1177/1756286418783708).
35. Esposito E, Ahn BJ, Shi J, Nakamura Y, Park JH, Mandeville ET, et al. Brain-to-cervical lymph node signaling after stroke. **Nat Commun.** 2019;10(1):5306. [doi:10.1038/s41467-019-13324-w](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13324-w).
36. Cai W, Shi L, Zhao J, Xu F, Dufort C, Ye Q, et al. Neuroprotection against ischemic stroke requires a specific class of early responder T cells in mice. **J Clin Invest.** 2022;132(15):e157678. [doi:10.1172/JCI157678](https://doi.org/10.1172/JCI157678).
37. Aderinto N, AbdulBasit MO, Olatunji G, Adejumo T. Exploring the transformative influence of neuroplasticity on stroke rehabilitation: a narrative review of current evidence. **Ann Med Surg (Lond).** 2023;85(9):4425-32. [doi:10.1097/MS9.0000000000001137](https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000001137).

38. Su F, Xu W. Enhancing Brain Plasticity to Promote Stroke Recovery. **Front Neurol**. 2020;11:554089. [doi:10.3389/fneur.2020.554089](https://doi.org/10.3389/fneur.2020.554089).
39. Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 $\beta$  Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. **Neural Plast**. 2018;2018:8430123. [doi:10.1155/2018/8430123](https://doi.org/10.1155/2018/8430123)
40. Lynch MA. Neuroinflammatory changes negatively impact on LTP: A focus on IL-1 $\beta$ . **Brain Res**. 2015;1621:197-204. [doi:10.1016/j.brainres.2014.08.040](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.040).
41. Liu H, Jiang M, Chen Z, Li C, Yin X, Zhang X, et al. The Role of the Complement System in Synaptic Pruning after Stroke. **Aging Dis**. 2024;16(3):1452-70. [doi:10.14336/AD.2024.0373](https://doi.org/10.14336/AD.2024.0373).
42. Wang Y, Leak RK, Cao G. Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke. **Front Cell Neurosci**. 2022;16:980722. [doi:10.3389/fncel.2022.980722](https://doi.org/10.3389/fncel.2022.980722).
43. Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka-Koga M, Noguchi Y, Kondo T, et al. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. **Nature**. 2019;565(7738):246-50. [doi:10.1038/s41586-018-0824-5](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0824-5).
44. Shi L, Sun Z, Su W, Xu F, Xie D, Zhang Q, et al. Treg cell-derived osteopontin promotes microglia-mediated white matter repair after ischemic stroke. **Immunity**. 2021;54(7):1527-1542.e8. [doi:10.1016/j.immuni.2021.04.022](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.022).
45. Maier M, Ballester BR, Verschure PFMJ. Principles of Neurorehabilitation After Stroke Based on Motor Learning and Brain Plasticity Mechanisms. **Front Syst Neurosci**. 2019;13:74. [doi:10.3389/fnsys.2019.00074](https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00074).

46. Langhorne P, Wu O, Rodgers H, Ashburn A, Bernhardt J. A Very Early Rehabilitation Trial after stroke (AVERT): a Phase III, multicentre, randomised controlled trial. **Health Technol Assess**. 2017;21(54):1-120. [doi:10.3310/hta21540](https://doi.org/10.3310/hta21540).
47. Dromerick AW, Geed S, Barth J, Brady K, Giannetti ML, Mitchell A, et al. Critical Period After Stroke Study (CPASS): A phase II clinical trial testing an optimal time for motor recovery after stroke in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2021;118(39):e2026676118. [doi:10.1073/pnas.2026676118](https://doi.org/10.1073/pnas.2026676118)
48. Shahid J, Kashif A, Shahid MK. A Comprehensive Review of Physical Therapy Interventions for Stroke Rehabilitation: Impairment-Based Approaches and Functional Goals. **Brain Sci**. 2023;13(5):717. [doi:10.3390/brainsci13050717](https://doi.org/10.3390/brainsci13050717).
49. French B, Thomas LH, Coupe J, McMahon NE, Connell L, Harrison J, et al. Repetitive task training for improving functional ability after stroke. **Cochrane Database Syst Rev**. 2016;2016(11):CD006073. [doi:10.1002/14651858.CD006073.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD006073.pub3)
50. Wiśniowska-Szurlej A, Leszczak J, Brożonowicz J, Ciapała G, Hernández-Lázaro H, Sozańska A. Effectiveness of a rehabilitation program involving functional proprioceptive stimulation for postural control and motor recovery among stroke patients: a double-blinded, randomized, controlled trial. **J NeuroEngineering Rehabil**. 2025;22(1):147. [doi:10.1186/s12984-025-01678-w](https://doi.org/10.1186/s12984-025-01678-w).
51. Cagney DN, Sul J, Huang RY, Ligon KL, Wen PY, Alexander BM. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. **Neuro Oncol**. 2018;20(9):1162-72. [doi:10.1093/neuonc/nox242](https://doi.org/10.1093/neuonc/nox242).

52. Anwar L, Ahmad E, Imtiaz M, Ahmad B, Awais Ali M, Mahnoor. Biomarkers for Early Detection of Stroke: A Systematic Review. **Cureus**. 2024;16(10):e70624. [doi:10.7759/cureus.70624](https://doi.org/10.7759/cureus.70624).
53. Barba L, D'Anna L, Abu-Rumeileh S, Foschi M, Montellano FA, Neugebauer H, et al. Implementing Blood Biomarkers in **Stroke** Research and Clinical Practice. *Stroke*. 2025;56(8):2380-4. [doi:10.1161/STROKEAHA.125.051498](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.125.051498)
54. Garcia-Rodriguez N, Garcia-Gabilondo M, Rodriguez S, Tejada PI, Miranda-Artieda ZM, Ridao N, et al. Identifying new blood biomarkers of neuroplasticity associated with rehabilitation outcomes after stroke. **Sci Rep**. 2025;15(1):38047. [doi:10.1038/s41598-025-21936-0](https://doi.org/10.1038/s41598-025-21936-0).
55. Limaye NS, Carvalho LB, Kramer S. Effects of Aerobic Exercise on Serum Biomarkers of Neuroplasticity and Brain Repair in Stroke: A Systematic Review. **Arch Phys Med Rehabil**. 2021;102(8):1633-44. [doi:10.1016/j.apmr.2021.04.010](https://doi.org/10.1016/j.apmr.2021.04.010).
56. Matsuda A, Yan IK, Foye C, Parasramka M, Patel T. miRNAs as paracrine signaling mediators in cancers and metabolic diseases. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2016;30(5):577-90. [doi:10.1016/j.beem.2016.07.005](https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.07.005).
57. Chang C, Wang Y, Wang R, Bao X. Considering Context-Specific microRNAs in Ischemic Stroke with Three «W»: Where, When, and What. **Mol Neurobiol**. 2024;61(10):7335-53. [doi:10.1007/s12035-024-04051-5](https://doi.org/10.1007/s12035-024-04051-5).
58. Ciaccio AM, Tuttolomondo A. Exosomal miRNAs as Biomarkers of Ischemic Stroke. **Brain Sci**. 2023;13(12):1647. [doi:10.3390/brainsci13121647](https://doi.org/10.3390/brainsci13121647).

59. Xu W, Gao L, Zheng J, Li T, Shao A, Reis C, et al. The Roles of MicroRNAs in Stroke: Possible Therapeutic Targets. **Cell Transplant**. 2018;27(12):1778-88. [doi:10.1177/0963689718773361](https://doi.org/10.1177/0963689718773361).
60. Loggini A, Hornik J, Hornik A. The role of microRNAs as super-early biomarkers in acute ischemic stroke: A systematic review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. 2024;244:108416. [doi:10.1016/j.clineuro.2024.108416](https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2024.108416).
61. Alijanpour S, Mostafazdeh-Bora M, Ahmadi Ahangar A. Different Stroke Scales; Which Scale or Scales Should Be Used? **Caspian J Intern Med**. 2021;12(1):1-21. [doi:10.22088/cjim.12.1.1](https://doi.org/10.22088/cjim.12.1.1).
62. Wang K, Lee I, Carlson G, Hood L, Galas D. Systems biology and the discovery of diagnostic biomarkers. **Disease markers**. 2010;28(4):199. [doi:10.3233/DMA-2010-0697](https://doi.org/10.3233/DMA-2010-0697).
63. Cai Y, Zhang Y, Ke X, Guo Y, Yao C, Tang N, et al. Transcriptome Sequencing Unravels Potential Biomarkers at Different Stages of Cerebral Ischemic Stroke. **Front Genet**. 2019;10:814. [doi:10.3389/fgene.2019.00814](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00814).
64. Liu X, He Y, Zhang N, Cai Y, Liu C. Identification of blood-brain barrier injury-related biomarkers in cerebral infarction using transcriptomic analysis. **Sci Rep**. 2026;16(1):8119. [doi:10.1038/s41598-026-39763-2](https://doi.org/10.1038/s41598-026-39763-2).
65. Stamova B, Knepp B, Rodriguez F. Molecular heterogeneity in human stroke – What can we learn from the peripheral blood transcriptome? **J Cereb Blood Flow Metab**. 2025;0271678X251322598. [doi:10.1177/0271678X251322598](https://doi.org/10.1177/0271678X251322598).

66. Jagodic A, Zivalj D, Krsek A, Baticic L. Genetic Architecture of Ischemic Stroke: Insights from Genome-Wide Association Studies and Beyond. **J Cardiovasc Dev Dis**. 2025;12(8):281. [doi:10.3390/jcdd12080281](https://doi.org/10.3390/jcdd12080281).
67. Ye Z, Ke H, Chen S, Cruz-Cano R, He X, Zhang J, et al. Biomarker Categorization in Transcriptomic Meta-Analysis by Concordant Patterns With Application to Pan-Cancer Studies. **Front Genet**. 2021;12:651546. [doi:10.3389/fgene.2021.651546](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.651546).
68. Bhuvaneshwar K, Gusev Y. Translational bioinformatics and data science for biomarker discovery in mental health: an analytical review. **Brief Bioinform**. 2024;25(2):bbae098. [doi:10.1093/bib/bbae098](https://doi.org/10.1093/bib/bbae098).
69. Gene Ontology Consortium, Aleksander SA, Balhoff J, Carbon S, Cherry JM, Drabkin HJ, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. **Genetics**. 2023;224(1):iyad031. [doi:10.1093/genetics/iyad031](https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031).
70. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**. 2000;28(1):27-30. [doi:10.1093/nar/28.1.27](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27).
71. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2005;102(43):15545-50. [doi:10.1073/pnas.0506580102](https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102).
72. Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. **BMC Bioinformatics**. 2013;14:7. [doi:10.1186/1471-2105-14-7](https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7).

73. Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. **Methods Mol Biol.** 2014;1182:289-305. [doi:10.1007/978-1-4939-1062-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_25).
74. Li T, Kang X, Zhang S, Wang Y, He J, Li H, et al. Integrating machine learning and multi-omics analysis to reveal nucleotide metabolism-related immune genes and their functional validation in ischemic stroke. **Front Immunol.** 2025;16:1561544. [doi:10.3389/fimmu.2025.1561544](https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1561544).
75. Liu J, Qing T, He M, Xu L, Wu Z, Huang M, et al. Transcriptomics, single-cell sequencing and spatial sequencing-based studies of cerebral ischemia. **Eur J Med Res.** 2025;30(1):326. [doi:10.1186/s40001-025-02596-2](https://doi.org/10.1186/s40001-025-02596-2).
76. Theofilatos K, Korfiati A, Mavroudi S, Cowperthwaite MC, Shpak M. Discovery of stroke-related blood biomarkers from gene expression network models. **BMC Med Genomics.** 2019;12(1):118. [doi:10.1186/s12920-019-0566-8](https://doi.org/10.1186/s12920-019-0566-8).
77. Chen G, Wu M, Chen J, Zhang C, Liu Q, Zhao Y, et al. Biomarkers associated with functional improvement after stroke rehabilitation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Front Neurol.** 2023;14:1241521. [doi:10.3389/fneur.2023.1241521](https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1241521).
78. Boyd LA, Hayward KS, Ward NS, Stinear CM, Rosso C, Fisher RJ, et al. Biomarkers of stroke recovery: Consensus-based core recommendations from the Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable. **Int J Stroke.** 2017;12(5):480-93. [doi:10.1177/1747493017714176](https://doi.org/10.1177/1747493017714176).
79. Manolescu BN, Berteanu M, Dumitru L, Dinu H, Iliescu A, Fărcășanu IC, et al. Dynamics of inflammatory markers in post-acute stroke patients undergoing rehabilitation. **Inflammation.** 2011;34(6):551-8. [doi:10.1007/s10753-010-9262-8](https://doi.org/10.1007/s10753-010-9262-8).

80. Yeh TT, Hsieh YW, Wu CY, Wang JS, Lin KC, Chen CL. A Preliminary Investigation of the Association of Sleep With Inflammation and Oxidative Stress Biomarkers and Functional Outcomes After Stroke Rehabilitation. **Sci Rep**. 2017;7:8634. [doi:10.1038/s41598-017-08931-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08931-w).
81. Ma F, Rodriguez S, Buxo X, Morancho A, Riba-Llena I, Carrera A, et al. Plasma Matrix Metalloproteinases in Patients With Stroke During Intensive Rehabilitation Therapy. **Arch Phys Med Rehabil**. 2016;97(11):1832-40. [doi:10.1016/j.apmr.2016.06.007](https://doi.org/10.1016/j.apmr.2016.06.007).
82. Gabriel-Salazar M, Morancho A, Rodriguez S, Buxó X, García-Rodríguez N, Colell G, et al. Importance of Angiogenin and Endothelial Progenitor Cells After Rehabilitation Both in Ischemic Stroke Patients and in a Mouse Model of Cerebral Ischemia. **Front Neurol**. 2018;9. [doi:10.3389/fneur.2018.00508](https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00508).
83. Koroleva ES, Tolmachev IV, Alifirova VM, Boiko AS, Levchuk LA, Loonen AJM, et al. Serum BDNF's Role as a Biomarker for Motor Training in the Context of AR-Based Rehabilitation after Ischemic Stroke. **Brain Sci**. 2020;10(9):623. [doi:10.3390/brainsci10090623](https://doi.org/10.3390/brainsci10090623).
84. Stanne TM, Angerfors A, Andersson B, Brännmark C, Holmegaard L, Jern C. Longitudinal Study Reveals Long-Term Proinflammatory Proteomic Signature After Ischemic **Stroke** Across Subtypes. **Stroke**. 2022;53(9):2847-58. [doi:10.1161/STROKEAHA.121.038349](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.038349).
85. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. **J Neuroinflammation**. 2019;16(1):142. [doi:10.1186/s12974-019-1516-2](https://doi.org/10.1186/s12974-019-1516-2).
86. Xie L, Sun F, Wang J, Mao X, Xie L, Yang SH, et al. mTOR signaling inhibition modulates macrophages/microglia-mediated neuroinflammation and

secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. **J Immunol.** 2014;192(12):6009-19. [doi:10.4049/jimmunol.1303492](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303492).

87. Li D, Wang C, Yao Y, Chen L, Liu G, Zhang R, et al. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type. **FASEB J.** 2016;30(10):3388-99. [doi:10.1096/fj.201600495R](https://doi.org/10.1096/fj.201600495R).

88. Bai M, Sun R, Cao B, Feng J, Wang J. Monocyte-related cytokines/chemokines in cerebral ischemic stroke. **CNS Neurosci Ther.** 2023;29(12):3693-3712. [doi:10.1111/cns.14368](https://doi.org/10.1111/cns.14368).

89. Liu W, Wang X, O'Connor M, Wang G, Han F. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Potential Therapeutic Role in Stroke Comorbidities. **Neural Plast.** 2020;2020:1969482. [doi:10.1155/2020/1969482](https://doi.org/10.1155/2020/1969482).

90. Shi G, Zeng P, Zhao Q, Zhao J, Xie Y, Wen D, et al. The Regulation of miR-206 on BDNF: A Motor Function Restoration Mechanism Research on Cerebral Ischemia Rats by Meridian Massage. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2022;2022:8172849. [doi:10.1155/2022/8172849](https://doi.org/10.1155/2022/8172849).

91. Eyiletlen C, Sharif L, Wicik Z, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Soplinska A, et al. The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke. **Mol Neurobiol.** 2021;58(1):329-47. [doi:10.1007/s12035-020-02101-2](https://doi.org/10.1007/s12035-020-02101-2).

92. Kunze R, Wacker P, Breuer P, Nasyrov E, Kur IM, Weigert A, et al. Adequate post-ischemic reperfusion of the mouse brain requires endothelial NFAT5. **acta neuropathol commun.** 2024;12(1):200. [doi:10.1186/s40478-024-01918-5](https://doi.org/10.1186/s40478-024-01918-5).

93. Gan H, Zhang M, Duan Y, Palahati A, He Q, Tan J, et al. Microglial NFAT5 aggravates neuroinflammation via mediating NLRP6 inflammasome in experimental ischemic stroke. **Genes Dis**. 2025;12(6):101614. [doi:10.1016/j.gendis.2025.101614](https://doi.org/10.1016/j.gendis.2025.101614).
94. He XW, Shi YH, Zhao R, Liu YS, Li GF, Hu Y, et al. Plasma Levels of miR-125b-5p and miR-206 in Acute Ischemic Stroke Patients After Recanalization Treatment: A Prospective Observational Study. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**. 2019;28(6):1654-61. [doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.02.026](https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.02.026).
95. Li H, Lai Y. The changes of serum inflammatory cytokines in patients with hemiplegia after ischemic stroke and the rehabilitation effects. **J Med Biochem**. 2025;44(5):994-1002. [doi:10.5937/jomb0-55968](https://doi.org/10.5937/jomb0-55968).
96. Pedersen BK. From the discovery of myokines to exercise as medicine. **Dan Med J**. 2023;70(9):A12220766.
97. Scheffer D da L, Latini A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. 2020;1866(10):165823. [doi:10.1016/j.bbadis.2020.165823](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165823).
98. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6, myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? **FEBS J**. 2013;280(17):4131-48. [doi:10.1111/febs.12338](https://doi.org/10.1111/febs.12338).
99. Frydelund-Larsen L, Penkowa M, Akerstrom T, Zankari A, Nielsen S, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. **Exp Physiol**. 2007;92(1):233-40. [doi:10.1113/expphysiol.2006.034769](https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.034769).

100. Li YS, Chen W, Liu S, Zhang YY, Li XH. Serum macrophage migration inhibitory factor levels are associated with infarct volumes and long-term outcomes in patients with acute ischemic stroke. **Int J Neurosci**. 2017;127(6):539-46. [doi:10.1080/00207454.2016.1211648](https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1211648).
101. Liu YC, Tsai YH, Tang SC, Liou HC, Kang KH, Liou HH, et al. Cytokine. MIF Enhances Blood-Brain Barrier Permeability: Impact for Therapy in Ischemic Stroke. **Sci Rep**. 2018;8(1):743. [doi:10.1038/s41598-017-16927-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16927-9)
102. Xuan W, Xie W, Li F, Huang D, Zhu Z, Lin Y, et al. Dualistic roles and mechanistic insights of macrophage migration inhibitory factor in brain injury and neurodegenerative diseases. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2023;43(3):341-56. [doi:10.1177/0271678X221138412](https://doi.org/10.1177/0271678X221138412).
103. D'Souza RF, Markworth JF, Aasen KMM, Zeng N, Cameron-Smith D, Mitchell CJ. Acute resistance exercise modulates microRNA expression profiles: Combined tissue and circulatory targeted analyses. **PLoS One**. 2017;12(7):e0181594. [doi:10.1371/journal.pone.0181594](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181594).
104. Xie F, Wang J, Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. **Funct Integr Genomics**. 2023;23(2):125. [doi:10.1007/s10142-023-01055-7](https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7).
105. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**. 2009;55(4):611-22. [doi:10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797).
106. Ma G, Wang Y, Li Y, Cui L, Zhao Y, Zhao B, et al. MiR-206, a key modulator of skeletal muscle development and disease. **Int J Biol Sci**. 2015;11(3):345-52. [doi:10.7150/ijbs.10921](https://doi.org/10.7150/ijbs.10921).

107. Ying H, Kang Y, Zhang H, Zhao D, Xia J, Lu Z, et al. MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway. **J Immunol**. 2015;194(3):1239-51.  
[doi:10.4049/jimmunol.1402088](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402088).
108. Zhang ZB, Xiong LL, Xue LL, Deng YP, Du RL, Hu Q, et al. MiR-127-3p targeting C1SD1 regulates autophagy in hypoxic–ischemic cortex. **Cell Death Dis**. 2021;12(3):279. [doi:10.1038/s41419-021-03541-x](https://doi.org/10.1038/s41419-021-03541-x).
109. Bian Y, Chen J, Yang J, Wu Q, Chen L, Wang H, et al. Influence of miR-127-3p on the Early Diagnosis Value and Prognostic Prediction of Ischemic Stroke in Hypertension Patients. **Am J Hypertens**. 2026;39(3):416-24.  
[doi:10.1093/ajh/hpaf201](https://doi.org/10.1093/ajh/hpaf201).
110. Song X, Liu J, Wang Y, Zheng L, Liu M. Serum microRNA miR-491-5p/miR-206 Is Correlated with Poor Outcomes/Spontaneous Hemorrhagic Transformation after Ischemic Stroke: A Case Control Study. **Brain Sci**. 2022;12(8):999. [doi:10.3390/brainsci12080999](https://doi.org/10.3390/brainsci12080999).
111. Edwardson MA, Shivapurkar N, Li J, Khan M, Smith J, Giannetti ML, et al. Expansion of plasma MicroRNAs over the first month following human stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2023;43(12):2130-43.  
[doi:10.1177/0271678X231196982](https://doi.org/10.1177/0271678X231196982).
112. Zhu H, Zhang Y, Zhong Y, Ye Y, Hu X, Gu L, et al. Inflammation-Mediated Angiogenesis in Ischemic Stroke. **Front Cell Neurosci**. 2021;15.  
[doi:10.3389/fncel.2021.652647](https://doi.org/10.3389/fncel.2021.652647).
113. Rowe DD, Collier LA, Seifert HA, Chapman CB, Leonardo CC, Willing AE, et al. Leukemia inhibitor factor promotes functional recovery and oligodendrocyte

survival in rat models of focal ischemia. **Eur J Neurosci**. 2014;40(7):3111-9. [doi:10.1111/ejn.12675](https://doi.org/10.1111/ejn.12675).

114. Vekaria HJ, Shelley SJ, Messmer SJ, Kunjadia PD, McLouth CJ, Sullivan PG, et al. Sex- and Tissue-Specific Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Mitochondrial Bioenergetics Following Ischemic Stroke. **Biomolecules**. 2025;15(5):738. [doi:10.3390/biom15050738](https://doi.org/10.3390/biom15050738).

115. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - a target for novel cancer therapy. **Cancer Treat Rev**. 2018;63:40-7. [doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007).

116. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **Trends Immunol**. 2001;22(2):83-7. [doi:10.1016/s1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(00)01812-3).

117. Zaremba J, Ilkowski J, Losy J. Serial measurements of levels of the chemokines CCL2, CCL3 and CCL5 in serum of patients with acute ischaemic stroke. **Folia Neuropathol**. 2006;44(4):282-9.

118. Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. **Int J Mol Sci**. 2017;18(10):2135. [doi:10.3390/ijms18102135](https://doi.org/10.3390/ijms18102135).

119. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. **Acta Physiol (Oxf)**. 2011;201(2):275-87. [doi:10.1111/j.1748-1708.2010.02174.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1708.2010.02174.x).

120. Nartea R, Savulescu S, Potcovaru CG, Poenaru D. Toward Precision Post-Stroke Rehabilitation Medicine: Integrating Molecular, Imaging, and Computational Biomarkers for Functional Outcome Prediction. **Journal of Clinical Medicine**. 2025;14(22):8077. [doi:10.3390/jcm14228077](https://doi.org/10.3390/jcm14228077).
121. Bai MY, Chuang MH, Lin MF, Tang SL, Wong CC, Chan WP. Relationships of Age and Sex with Cytokine Content and Distribution in Human Platelet Fibrin Gels. **Sci Rep**. 2018;8(1):10642. [doi:10.1038/s41598-018-28376-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28376-z).
122. Simats A, García-Berrocso T, Montaner J. Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. **Biochim Biophys Acta**. 2016;1862(3):411-424. [doi:10.1016/j.bbadis.2015.10.025](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.025)
123. Babić A, Bonifačić D, Komen V, Kovačić S, Mamić M, Vuletić V. Blood Biomarkers in Ischemic Stroke Diagnostics and Treatment—Future Perspectives. **Medicina**. 2025;61(3):514. [doi:10.3390/medicina61030514](https://doi.org/10.3390/medicina61030514).
124. Harrison JK, McArthur KS, Quinn TJ. Assessment scales in stroke: clinimetric and clinical considerations. **Clin Interv Aging**. 2013;8:201-11. [doi:10.2147/CIA.S32405](https://doi.org/10.2147/CIA.S32405).
125. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, et al. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. **PLOS ONE**. 2013;8(6):e64795. [doi:10.1371/journal.pone.0064795](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064795).
126. Zendjabil M. Preanalytical, analytical and postanalytical considerations in circulating microRNAs measurement. **Biochem Med (Zagreb)**. 34(2):020501. [doi:10.11613/BM.2024.020501](https://doi.org/10.11613/BM.2024.020501).

127. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. **Brief Bioinform.** 2016;17(2):204-12. [doi:10.1093/bib/bbv056](https://doi.org/10.1093/bib/bbv056).

## ANEXOS

### ANEXO A. Resumen de los posibles biomarcadores.

Grupo	Marcadores	Escala
Marcadores asociados con mejor recuperación neurológica	<b><math>\beta</math>-NGF.</b>	NIHSS
Marcadores asociados con una menor discapacidad funcional	<b>IFN-<math>\gamma</math>, SCF.</b>	mRS
Marcadores asociados con mejoría en fuerza muscular	<b>GM-CSF, HGF, IL-6, IL-13, IL-10, IL-16, IP-10, LIF, MIG/CXCL9, MIP-1<math>\alpha</math>, RANTES, M-CSF, SDF-1<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-NGF, mir206.</b>	Lovett
Marcadores asociados con respuesta global a la rehabilitación	<b>IL-16, GM-CSF.</b>	IRG
Marcadores persistentemente alterados frente a controles	<b>MIG/CXCL9, HGF, LIF.</b>	Elevados vs control
Marcadores elevados después de la rehabilitación	<b>IL-13, <math>\beta</math>-NGF, MIP1<math>\alpha</math>, IL-8, IL-6, IFN-<math>\gamma</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-3, M-CSF.</b>	Elevados vs control

### ANEXO B. Resumen gráfico.

