Universidad de Alcalá
Departamento de Biología de Sistemas

NUEVOS BENEFICIOS DE LA ELECTROESTIMULACIÓN COMO AGENTE TERAPÉUTICO FÍSICO

Autor: Andresa Evelem de Melo Aroeira

Tutor / Director de Tesis: Pedro de la Villa Polo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
2020

Andresa Evelem de Melo Aroeira
Nuevos beneficios de la electroestimulación como agente terapéutico físico
2020

Universidad de Alcalá
Departamento de Biología de Sistemas

TESIS DOCTORAL

Nuevos beneficios de la electroestimulación como agente terapéutico físico

Andresa Evelem de Melo Aroeira

Alcalá de Henares 2020

A mis padres y a mi hermana, siempre.
A mi hijo Lucas, que es la luz que me guía.
A mi compañero Rafael, por creer en mí y
acompañarme en este sueño.

AGRADECIMIENTOS

De forma inusual, doy gracias a Dios por finalmente finalizar esta tesis doctoral.

Recuerdo el día que llegué a la Unidad de Fisiología, estaba muy emocionada por entrar en este mundo. Hoy, 5 años después, por fin, la TESIS. En mi equipaje llevo mucho más que enriquecimiento intelectual y el deseo de seguir investigando, llevo también todos los buenos momentos vividos, todos los cafés con leche y napolitanas y lo mejor, los buenos amigos que hice.

Quería deciros que sin vosotros eso no hubiera sido posible. Todos habéis contribuido, directa o indirectamente, a la realización de este trabajo, y a todos vosotros os doy ***las gracias.***

Agradezco, de corazón, a mi tutor y director de tesis el ***Dr. Pedro de la Villa***¸ por haber creído y confiado en mí. Gracias por la oportunidad que me diste de participar en este estudio. Te agradezco enormemente todas tus enseñanzas, paciencia, amabilidad, creatividad y por supuesto, tu buen humor. Eres un ser humano increíble.

Pedro Valenzuela, gracias por meterme en el laboratorio, por incluirme en algunos de tus proyectos y por toda tu paciencia.

Lauritela, gracias por haberme acogido en “tu laboratorio”, por todo el apoyo ofertado, por tu amistad, por los gritos, enseñanzas y correcciones. Fuiste una de las personas que más me animó a seguir adelante. Gracias.

Santi, gracias por estas mañanas tan melancólicas, que al final, siempre se convertían en momentos de alegría y risas.

Fran, Javi, Rima, Estrella, también sois partícipéis de eso.

Carlos Amo, gracias por darme la oportunidad de participar en uno de tus proyectos de investigación, ha sido un gran placer trabajar contigo.

Las Patris, gracias por todo el cariño, amistad, compañerismo y por la enorme paciencia enseñándome el Western Blot.

Maripi y Gema, gracias por haberme permitido utilizar vuestro laboratorio y aparatos.

Obrigada a meus pais, ***Elba e Abidiel***, por sempre acreditarem em mim, pelo amor e apoio incondicional, e por todo incentivo que me deram, principalmente econômico.

Obrigada a minha irmã, ***Angelica***, que sempre me escutou, me apoiou e sempre me teve uma palavra de conforto.

Obrigada a meu marido, ***Rafael***, por todo apoio, companheirismo, incentivo e paciência em todos esses anos.

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis Doctoral pretende explorar nuevos beneficios de la electroestimulación como agente terapéutico físico. Para ello se han llevado a cabo dos estudios en paralelo. El primero, realizado sobre animales de experimentación, dirigido a la evaluación de la electroestimulación neuromuscular (NMES) como agente terapéutico para la mejora de las propiedades funcionales del músculo. Y el segundo, sobre participantes voluntarios, dirigido a la evaluación de la estimulación transcraneal de corriente continua (tDCS) como agente terapéutico para el tratamiento del sobrepeso.

El objetivo del primer estudio fue analizar los efectos del entrenamiento de NMES sobre la estructura, función, capacidad oxidativa y vascularización del músculo esquelético utilizando un modelo experimental de ratón. El músculo tibial anterior izquierdo en ratones se estimuló eléctricamente mientras que el músculo derecho se mantuvo como control. La extremidad estimulada se sometió a sesiones diarias de NMES (100 Hz) durante dos semanas. El entrenamiento NMES aumentó la masa muscular, el área de sección transversal media de la fibra, la fuerza máxima y la tasa de desarrollo de fuerza, sin efectos sobre el perfil oxidativo muscular. Estos resultados demuestran que NMES induce hipertrofia muscular y mejora las propiedades contráctiles del músculo tibial anterior en este modelo experimental. Asimismo, demostramos que la electroestimulación promueve la adaptación muscular semejante a la que ocurre con el ejercicio voluntario, visto a través de la tendencia a la transición de las isoformas de la cadena pesada de la miosina y del aumento de células satélite. Por tanto, este modelo animal parece ser adecuado para el estudio de procesos hipertróficos inducidos por la estimulación eléctrica del músculo.

En el segundo estudio se planteó que el índice de masa corporal (IMC) alto se asocia con deficiencias neurocognitivas que contribuyen a comer en exceso e

interfieren con los esfuerzos para perder peso. La neuromodulación no invasiva representa un enfoque novedoso, asequible y escalable para mejorar la función neurocognitiva en este contexto. El propósito de este segundo estudio fue examinar si la estimulación transcraneal de corriente continua aplicada sobre la corteza prefrontal, en combinación con una dieta hipocalórica, podría mejorar la pérdida de peso. El estudio se llevó a cabo sobre 38 mujeres con un IMC de 25 a 35 kg/m^2 que se sometieron a una intervención en paralelo, con casos activos y casos controles, aleatorizado, doble ciego y de 4 semanas de duración, durante las cuales recibieron ocho sesiones de tDCS (n = 18 controles, n = 20 activos) en combinación con una dieta hipocalórica (20 kcal/kg/día). Evaluamos los cambios longitudinales en el peso corporal, el apetito y el ansia por la comida. Además, examinamos la contribución de los procesos cognitivo-ejecutivos a través de tareas computarizadas modificadas con alimentos. Nuestros resultados permitieron observar que el grupo activo tuvo más reducción en el peso corporal que el grupo control durante todo el estudio y una pérdida de peso semanal significativa. Los componentes del apetito subjetivo y el deseo de comer mostraron una tendencia hacia una mayor reducción en el grupo activo. Estos cambios fueron paralelos a mejoras significativas en el desempeño de la tarea en el grupo activo, particularmente en una tarea dual que requería control inhibitorio y memoria de trabajo. No se observaron efectos adversos significativos. Nuestros resultados proporcionan una prueba de concepto que valida el uso de la tDCS dirigida a la corteza cerebral prefrontal, combinada con dieta, en mujeres de mediana edad con exceso de peso corporal, allanando el camino para estudios más amplios que evalúen la eficacia clínica y los efectos a largo plazo de esta intervención.

SUMMARY

This Doctoral Thesis aims to explore new benefits of electrostimulation as a physical therapeutic agent. The experimental work includes two research projects that have been carried out in parallel. The first one, carried out on experimental animals, aimed the evaluation of neuromuscular electrostimulation (NMES) as a therapeutic agent for the improvement of the functional properties of the muscle. And the second one, on volunteer participants, aimed the evaluation of transcranial direct current stimulation (tDCS) as a therapeutic agent for the treatment of overweight.

The objective of the first study was to analyse the effects of NMES training on the structure, function, oxidative capacity and vascularization of skeletal muscle using a mouse model. The left tibialis anterior muscle in experimental mice was electrically stimulated while the right muscle was kept as a control. The stimulated limb was subjected to daily sessions of surface NMES (100 Hz) for two weeks. NMES training increased muscle mass, mean fiber cross-sectional area, maximal strength, and rate of strength development, with no effect on muscle oxidative profile. These results demonstrate that the NMES induced muscle hypertrophy and instigated an improvement in the contractile properties of the tibialis anterior muscle in this experimental model. Likewise, we demonstrate that electrostimulation promotes muscular adaptation similar to that which occurs with voluntary exercise, seen through the tendency to transition of myosin heavy chain isoforms and the increase in satellite cells. Therefore, this animal model seems to be suitable for the study of hypertrophic processes induced by electrical stimulation of the muscle.

The second study suggested that high body mass index (BMI) is associated with neurocognitive deficiencies that contribute to overeating and interfere with efforts to lose weight. Non-invasive neuromodulation represents a novel, affordable, and scalable approach to improve neurocognitive function in this setting. The purpose of this second study was to examine whether transcranial direct current stimulation applied to the prefrontal cortex, in combination with a hypocaloric diet, could improve weight loss. The study was carried out on 38 women with a BMI of 25 to 35 kg / m2 who underwent a parallel intervention, with active cases and case controls, randomized, double-blind studi of 4 weeks duration, during which they received eight sessions of tDCS (n = 18 controls, n = 20 active) in combination with a diet (20 kcal / kg / day). We assess longitudinal changes in body weight, appetite, and food craving. Furthermore, we examined the contribution of cognitive-executive processes through computerized food-modified tasks. Our results allowed us to observe that the active group experienced more reduction in body weight than the control group throughout the study and a significant weekly weight loss. The components of subjective appetite and food craving showed a trend towards a greater reduction in the active group. These changes paralleled significant improvements in task performance in the active group, particularly in a dual task that required inhibitory control and working memory. No significant adverse effects were observed. Our results provide a proof of concept that validates the use of prefrontal cortex-directed tDCS, combined with diet, in middle-aged women with excess body weight, paving the way for larger studies evaluating clinical efficacy and effects to long term of this intervention.

ÍNDICE

RESUMEN i
ABSTRACT iii
ÍNDICE v
ÍNDICE DE FIGURAS vii
ÍNDICE DE TABLAS ix
ABREVIATURAS x

INTRODUCCIÓN 1

DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA ELECTROESTIMULACIÓN COMO MÉTODO TERAPÉUTICO 3

ELECTROESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR 12

Anatomía y Fisiología del Sistema Músculo Esquelético 12
Estimulación Eléctrica del Músculo 17

ELECTROESTIMULACIÓN TRANSCRANEAL 22

La Corteza Cerebral 22
Estimulación Transcraneal por Corriente Directa (tDCS) 26

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 31

HIPÓTESIS 33

OBJETIVOS 34

Generales: 34
Específicos: 34

MATERIALES Y MÉTODOS 35

ESTUDIO DE ESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 37

Grupo Experimental 38
Grupo Control 40
Variables del Estudio 40
Marcaje Histoquímico e Inmunohistoquímico 43
Pruebas Moleculares: Western Blot 47

ESTUDIO DE ELECTROESTIMULACIÓN TRANSCRANEAL 50

Diseño de Estudio y Protocolo 50
Dieta Hipocalórica 51
tDCS 52
Cegamiento del Estudio 53
Variables del Estudio 53
Efectos adversos 57

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 57

RESULTADOS 59

CAPITULO 1: ELECTROESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR: 61
Contenido en Fibras Musculares del Músculo Tibial Anterior..... 61
Efectos del Entrenamiento Mediante Electroestimulación Sobre las Características Estructurales del Músculo..... 62
Efectos del Entrenamiento Mediante Electroestimulación Sobre las Características Funcionales Del Músculo..... 64
Efectos del Entrenamiento Mediante Electroestimulación Sobre los Subtipos de Fibras Musculares 67
Adaptaciones Angiogénicas, Miogénicas y del Tejido Conectivo por Efecto de la Electroestimulación 70
CAPITULO 2: ELECTROESTIMULACIÓN TRANSCRANEAL 73
Participantes..... 73
Efectos Sobre el Peso Corporal 74
Efectos Sobre el Apetito..... 76
Efectos sobre el Ansia de Comer 76
Efectos Neurocognitivos..... 77
Efectos Adversos 79
DISCUSIÓN 81
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: EFECTIVIDAD DE LA ELECTROESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR SOBRE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL MÚSCULO 83
Características y Función Muscular 83
Distribución de MHC 85
Células Satélites y Dominio Mionuclear 85
Angiogénesis..... 87
ENSAYO CLÍNICO: EFECTIVIDAD DE LA CORRIENTE CONTINUA TRANSCRANEAL SOBRE EL CONTROL DEL APETITO Y PÉRDIDA DE PESO. 88
CONCLUSIONES 91
BIBLIOGRAFÍA 95
ANEXOS 113
ANEXO I..... 115
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA FORMACIÓN DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD 115
ANEXO II..... 117
CUESTIONARIOS..... 117

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	*TÍTULO*	Página
Figura 1	***Botella de Leyden……..***	5
Figura 2	***Demostración realizada por Aldini……***	9
Figura 3	***Batería médica……...***	10
Figura 4	***Inervación de las fibras musculares……***	12
Figura 5	***Organización del músculo esquelético ……..……***	13
Figura 6	***Lóbulos cerebrales …...……***	23
Figura 7	***La corteza cerebral, especialización de los hemisferios……***	24
Figura 8	***Sistema Internacional 10-20 para la colocación de los electrodos extracraneales……..***	29
Figura 9	***Ilustración del posicionamiento y disposición de los electrodos para las sesiones de NMES……***	39
Figura 10	***Ilustración del posicionamiento para la realización de las pruebas funcionales……...***	41
Figura 11	***Diagrama de distribución de muestras……..***	43
Figura 12	***Esquema del proceso de marcaje inmunohistoquímico……***	47
Figura 13	***Esquema del proceso de Western blot……...***	49
Figura 14	***Diseño experimental del estudio de tDCS ……***	51
Figura 15	***Ilustración del posicionamiento de los electrodos…...***	53
Figura 16	***Ilustración de la prueba neuropsicológica……..***	57
Figura 17	***Secciones transversales representativas del músculo tibial anterior de ratón……***	62
Figura 18	**Efecto del entrenamiento mediante la electroestimulación neuromuscular**……..**……**	63

Figura 19 ***Área transversal de las fibras del músculo tibial anterior según su tipología***…….. 64
Figura 20 ***Efectos de la electroestimulación neuromuscular sobre las propiedades contráctiles del músculo …....*** 66
Figura 21 **Efectos del entrenamiento de electroestimulación neuromuscular sobre las propiedades contráctiles del músculo*…….*** 67
Figura 22 ***Distribución de las fibras musculares marcadas por técnicas inmunohistoquímica……*** 68
Figura 23 ***Distribución de las fibras musculares marcadas por técnicas inmunohistoquímica……...…….*** 69
Figura 24 **Expresión del contenido protéico de tras la electroestimulación neuromuscular……....** 70
Figura 25 ***Marcaje de los capilares musculares, mionúcleos y células satélites por técnicas inmunohistoquímicas…….……..*** 71
Figura 26 ***Variaciones en la capilarización, número de núcleos y células satélites por efecto de la electroestimulación neuromuscular…….*** 72
Figura 27 ***Efecto de la tDCS sobre el peso corporal…….*** 75
Figura 28 ***Efectos de tDCS sobre el apetito y ansia de comida….*** 77

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	*TÍTULO*	Página
Tabla 1	***Tipos de fibras musculares de mamíferos y características ……...***	16
Tabla 2	***Anticuerpos utilizados para el marcaje inmunocitoquímico ……..***	46
Tabla 3	***Características de ratones C57BL/6J y del músculo tibial anterior de ratones tras el estudio……***	63
Tabla 4	***Efectos de la electroestimulación en la función contráctil del musculo TA…….***	65
Tabla 5	***Características basales de las participantes de ambos grupos……...***	74
Tabla 6	***Tareas neurocognitivas……..…….***	78
Tabla 7	***Efectos adversos…….***	79

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
Ach	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
CSA	Área de sección trasversal
CT	Control
Cw	Concentración de trabajo
C57	Ratón control sano de fondo genético C57BL/6J
DAPI	4’, 6-diamidino-2-fenilindol
DC	Corriente continua directa
DLPFC	Corteza dorsolateral prefrontal
EE	Estimulo eléctrico
EEG	Electroencefalograma
ESB	Electroestimulación cerebral
EVA	Escala Visual Analógica
FCQ-S	Estado – Cuestionario de Ansia por la comida
FCQ-T	Rasgo – Cuestionario de ansia por la comida
FCSA	Área de sección trasversal de las fibras
FES	Estimulación eléctrica funcional
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HEPA	Filtro de aire de alta eficiencia
IMC	Índice de Masa Corporal
MHC	Cadena pesada de miosina
NMES	Electroestimulación neuromuscular
PBS	Tampón fosfato salino

PFA	Paraformaldehído
PVDF	Polivinildifluoruro
REPS	Repeticiones
SC	Células satélites
SNC	Sistema nervioso central
ST	Estimulado
TA	Tibial anterior
tDCS	Electroestimulación transcraneal por corriente directa
TEC	Terapia electroconvulsiva
TENS	Estimulación eléctrica transcutánea
TFEQ	Cuestionario de alimentación de tres factores

INTRODUCCIÓN

La fisioterapia tiene como principales objetivos prevenir, mantener y restaurar la movilidad física de los pacientes y para eso, dispone de diversas especialidades y herramientas. Dentro de esas se encuentra la electroterapia, que es una de las principales herramientas utilizada en el ámbito de la fisioterapia, principalmente a nivel muscular, y puede ser utilizada desde la prevención de la atrofia muscular en pacientes encamados, hasta la mejoría de la fuerza muscular en deportistas de élite. Sin embargo, la electroterapia en la fisioterapia puede ir más allá del nivel periférico, como puede ser el caso de la electroestimulación transcraneal. Debido a que el sobrepeso y la obesidad suelen estar asociadas a pérdida de funcionalidad y/o de la movilidad física, disponer de una herramienta que pueda estimular cambios conductuales a nivel central a la vez que se trabaja a nivel físico, permitiría desarrollar un tratamiento integral del paciente.

DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA ELECTROESTIMULACIÓN COMO MÉTODO TERAPÉUTICO

La palabra "**electroterapia**" está formada con raíces griegas donde sus componentes léxicos son: *elektron* (ámbar – electricidad) y *3erapia* (tratamiento médico), siendo así, su etimología consiste en "tratamiento médico mediante la electricidad".

El uso de la electricidad como método terapéutico no es nada reciente. Mucho antes de que se hubieran realizado estudios científicos acerca del uso de la electricidad como instrumento de terapia, ya existían una cantidad de conocimientos prácticos obtenidos a través de experiencias realizadas con las descargas de peces eléctricos (1).

La producción de corriente eléctrica por algunos peces se conocía desde la época de los egipcios (2750 a. C.). Sin embargo, fue *Aristóteles* en 348-322 a. C. quien descubrió que las placas eléctricas de los laterales de la cabeza del pez torpedo

podían aliviar los ataques de gotas mientras el pez vivo era colocado sobre la zona dolorosa (2).

En el siglo I, *Scribonius Largus*, médico oficial del emperador romano Claudio, tuvo acceso a archivos médicos dispersos en todo el imperio romano e incorporó los remedios que tenían eficacia comprobada y compiló un formulario de prescripciones que fue considerado un hito en medicina desde la época de *Hipócrates* (460 a. C. – 370 a. C.) hasta *Galeno* (130 d. C – 200 d. C.). Los primeros registros terapéuticos del uso de la electricidad recomendaban el uso de las descargas eléctricas del pez torpedo (raya eléctrica) de la familia *Torpedinidae* que podían producir descargas de aproximadamente 45 voltios (3).

También se sabe que los primeros exploradores y colonos de América del Sur relataron que los indios solían utilizar la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus,* anteriormente *Gymnotus electricuspara*) para tratar la gota. Estos podían producir descargas eléctricas que alcanzaban hasta casi 600 voltios. Otros relatos marcan que en China utilizaban el pez gato eléctrico (*Parasilurus asota*) para el tratamiento de la ptosis y de la parálisis facial. Varias farmacopeas fueron encontradas en los registros como en esta descripción:

"*Para cualquier tipo de gota, un torpedo negro vivo deberá, cuando el dolor comienza, colocarse bajo los pies. El paciente deberá pararse en una playa húmeda bañada por el mar y permanecer de este modo hasta que todo el pie y la pierna hasta la rodilla estén adormecidos*" (4).

En el siglo XVIII, tras varios años de afirmaciones y descubrimientos, se extendió el uso de la electricidad para tratamientos de diversas enfermedades. Sin embargo, las fuentes animales para la electroterapia fueron poco fiables en términos de suministros y disposición de los animales. Así, se empezó a llevar a cabo la generación de electricidad por medios artificiales equipados con generadores

estáticos y grandes botellas de *Leyden* (Figura 1) (1). *Benjamin Franklin* fue uno de los principales defensores de la electroterapia, y a menudo, trató diversos pacientes con parálisis y con crisis convulsivas (5). *John Wesley*, fundador del Metodismo, estaba tan convencido del poder de la electroterapia que hizo llevar cuatro generadores estáticos a Londres para tratar enfermedades. Además, publicó un libro que enaltecía las virtudes de esta técnica “la medicina más noble jamás conocida en el mundo” (1).

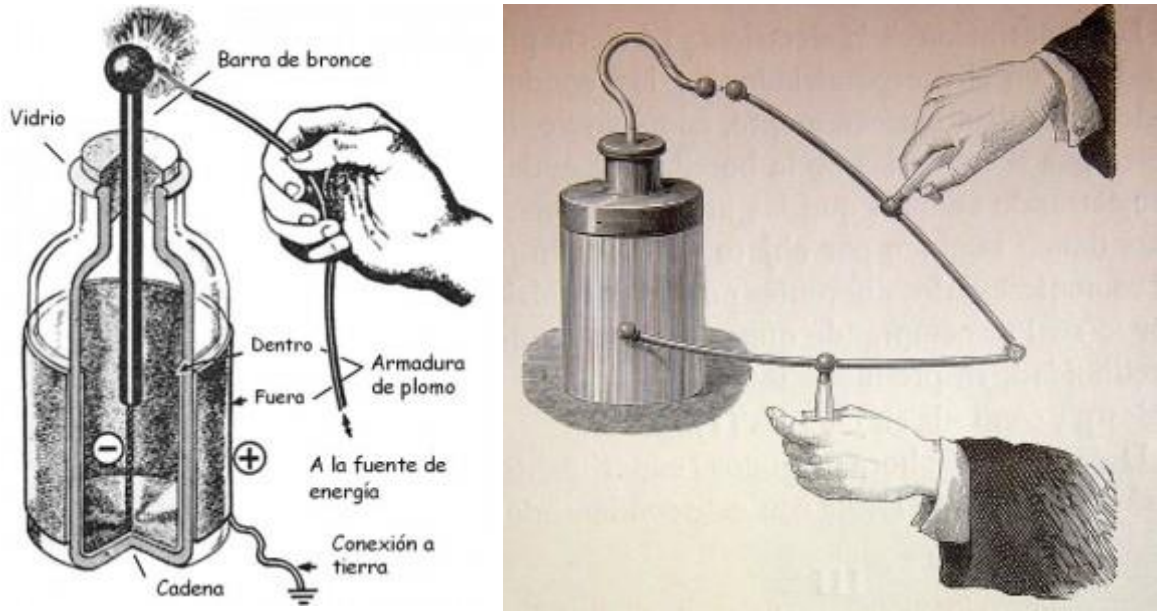

Figura 1: Botella de *Leyden*. Su invención en el sigo XVIII hizo posible el empleo de electricidad en cantidades significativas para experimentos científicos, visto que era usada para almacenar la electricidad (1). Ilustración obtenida del internet (6).

Con la aceptación del hecho de que la electricidad animal no era diferente de la electricidad común, y, en medio de grandes especulaciones y creciente interés, *Luigi Galvani*, profesor de anatomía de la Universidad de Bolonia, anuncia que las patas de las ranas se contraían bajo estimulación eléctrica. Lo demostró aplicando una corriente eléctrica a través de la medula espinal de una rana muerta y consiguió movimientos de los músculos de las patas, y defendió que la electricidad responsable de la contracción muscular era de origen animal (7). Sin embargo, *Alessandro Volta* no estuvo de acuerdo y argumentó que dependía de otros factores

como los metales utilizados para sujetar la rana y la humedad existente (8). A raíz de este pensamiento, se inventó la pila voltaica que permitía obtener una corriente eléctrica continua y estable, siendo uno de los más importantes descubrimientos sobre la electricidad y es denominada como corriente galvánica debido su aprecio y admiración por *Galvani* (9).

Más adelante, en el siglo XIX, el uso de la electricidad con fines terapéuticos tuvo un amplio desarrollo. En 1801, *Ritter* observó la importancia del aumento de la amplitud del estímulo para poder producir la contracción muscular. *Michael Faraday*, en 1831, descubre el fenómeno de la inducción eléctrica y a partir de ella elabora la primera corriente eléctrica continua (10). Posteriormente, en 1833, *Duchenne de Boulogne* (*Guillaume Duchenne*) diseña los electrodos de superficie y el método de localización de los puntos motores (9). En 1850 publica los resultados de los tratamientos de patologías usando métodos eléctricos (10) y fue reconocido como el padre de la electroterapia. Aún en este siglo, *Leduc* establece que una sustancia ionizada, cuando está en contacto con la piel y sometida a una corriente eléctrica directa, podía penetrar la piel, efecto conocido como *iontoforesis (9)*.

Al inicio del sigo XX, *Lapique* descubre la relación entre la reobase (mínima intensidad de corriente capaz de producir un potencial de acción) y la cronaxia (el tiempo necesario para que una intensidad doble de la reobase produzca efecto), es decir la relación entre intensidad y duración de estímulo necesaria para alcanzar la excitabilidad del tejido (11).

Posteriormente, en estudios de *Bernard* (1925) ya se ve el uso de nuevas corrientes, como las diadinámicas y las corrientes interferenciales. Las interferenciales fueron perfeccionadas y se diseñó un nuevo protocolo para la aplicación de la estimulación eléctrica funcional (FES, por su sigla en inglés *Functional Electrical Stimulation*) (2,9). Los años entre 1870 y 1920 fueron considerados la edad de oro de la

electroterapia, pues fue la época en que se volvió muy popular su uso en Estados Unidos y Europa (12).

En 1965, *Melzack* y *Walls* desarrollan las corrientes TENS (estimulación eléctrica transcutánea) como una corriente antiálgica, que actúa sobre el mecanismo de control del dolor, por la teoría de la compuerta.

Cinco años después, en 1970, el ruso *Kots* decide combinar la electroestimulación con el entrenamiento de la fuerza muscular en deportistas. A partir de ahí la literatura también empieza a emplear este método como forma de entrenamiento y rara vez como instrumento terapéutico o para ensayos experimentales (2,9).

Por otro lado, mientras continuaban los estudios en el sistema neuromuscular, también se hacían avances del uso de la corriente eléctrica para el tratamiento de trastornos y enfermedades mentales.

En el siglo XVIII médicos respetados como *Richard Lovett* y *Erasmus Darwin* trataban la epilepsia con electroterapia. A finales de este mismo siglo, también se utilizaba la electroterapia para el tratamiento de diversas enfermedades mentales, como la histeria, siendo este el principal “desorden mental” tratado con la electroterapia, visto que asociaban la pérdida o el impedimento del habla con la histeria. Se realizaba a través de electrodos dispuestos sobre la laringe donde se aplicaban descargas de electricidad de 3 a 4 segundos de duración (13). Se cree que *Caldini’s* en 1784 fue el primero a usar la electroestimulación cerebral (ESB, por su sigla en inglés *Electrical Stimulation of the Brain*) en ranas (14). Sin embargo, el primer registro de pacientes con trastorno mentales tratados con corrientes eléctricas aplicadas directamente en la superficie craneal es de *John Birch,* en 1787, donde trató el estado de melancolía de un hombre. Utilizaba el siguiente procedimiento: cubría la cabeza del hombre con una franela y frotaba las chispas eléctricas por todo el cráneo. La sesión se realizó una vez por semana durante

aproximadamente 3 meses y los resultados fueron sorprendentemente positivos (15).

Posteriormente, en 1802 *Giovanni Aldini* se dio a conocer por sus experimentos utilizando humanos y cadáveres de animales. En uno de sus experimentos, realizaba la decapitación de algunos animales y demostraba que la corriente era capaz de producir movimientos espasmódicos de los músculos faciales, brazos y piernas (Figura 2), aunque estuvieran muertos. En 1803, *Aldini* hizo el primer experimento utilizando el cuerpo de un hombre muerto, donde aplicó la corriente galvánica en diversas partes de su cuerpo produciendo movimientos involuntarios. No obstante, *Aldini,* también aplicó la corriente galvánica sobre su propia cabeza y relató las sensaciones y efectos que la misma producía, y concluyó que podía ser beneficiosa para el tratamiento de trastornos mentales. Entonces, en 1804, la corriente galvánica, o corriente continua directa (DC, por su sigla en inglés *Direct Current*), fue la terapia de elección para el tratamiento de pacientes melancólicos (15-17).

Casi setenta años después (1870), *Fritsch* y *Hitzig's* publican el primer estudio de electroestimulación cerebral en perros y reafirman que la corteza cerebral es eléctricamente excitable. Más adelante, en 1874, *Bartholow,* realizó la primera estimulación cerebral en humanos a través de electrodos de aguja insertados sobre el tejido cerebral encontrándose el paciente en estado de alerta; sin embargo, sus experimentos ocasionaron la muerte del paciente (14).

En 1858, *Robert Remak* publicó "*Galvanoterapia*" donde recomendaba el uso de la corriente constante (galvánica) en condiciones mórbidas del cerebro acompañadas con desordenes funcionales (10). Entre los años de 1870 – 1920 el uso de la electricidad se convirtió en la modalidad terapéutica más común dado que ya se habían expandido los estudios y publicaciones sobre este método terapéutico, incluyendo su uso en psiquiatría (10). Los fabricantes se aprovecharon del

entusiasmo por la electricidad, así como de la falta de conocimiento de la población, y empezaron a fabricar y a vender todo tipo de dispositivos compuesto por una batería y cables que se promocionaban como tratamiento para las más diversas patologías (18).

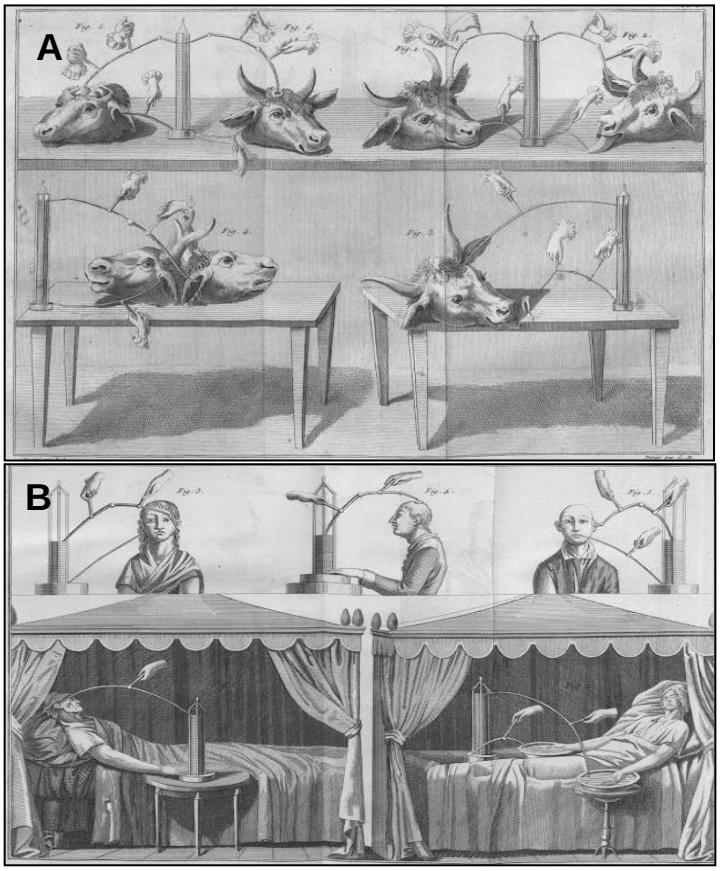

Figura 2: Demostración realizada por *Aldini*. Experimento diseñado para evocar movimientos espasmódicos de los músculos faciales de animales mediante corriente eléctrica y tratamiento de algunas enfermedades mentales utilizando la electroterapia**. (A)** Después de cortar la cabeza del buey, el autor hacía que la corriente de una batería pasara por ella a través de una varilla. El simple contacto producía contracciones musculares y convulsiones; **(B)** Las 3 imágenes de arriba demuestran el tratamiento de personas que padecían trastornos mentales. Los electrodos fueron dispuestos en diferentes posiciones del cuero cabelludo que se conectaban a una célula voltaica para la estimulación. La imagen superior central muestra un paciente conectado a través de la mano izquierda y el cuero cabelludo, con las manos humedecidas de agua salada. Las dos imágenes de abajo son pacientes recién fallecidos conectados directamente (izquierda) o por solución salina (derecha) a una célula voltaica (16)

Durante los años finales del siglo XIX y principios del siglo XX, se popularizó el uso de la batería médica, que era un aparato parecido a una caja de zapatos que contenía una batería en su interior conectada a un cable envuelto alrededor de un núcleo de hierro y que permitía la producción de corriente continua, galvánica, y/o corriente alterna, farádica (Figura 3). Para la corriente farádica los electrodos eran conectados a la batería, luego uno de ellos era colocado debajo de los pies del paciente mientras el segundo electrodo se frotaba sobre el cuerpo del paciente. Para la aplicación de la corriente galvánica el electrodo fijo se colocaba sobre el estómago del paciente en lugar de debajo de los pies. Se creía que la estimulación eléctrica podía curar una amplia variedad de dolencias, y estaba básicamente arraigados al somaticismo (12,18,19).

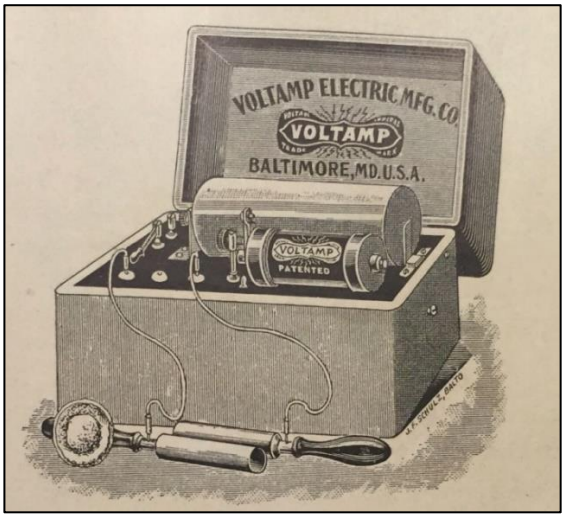

Figura 3: Batería médica. Batería número 4 de Voltamp Electric Manufacturing Co, como se anuncia en el catálogo de 1904 de la compañía (18)

Igual que los demás dispositivos, la batería medica también fue vendida para tratamiento en el domicilio, donde el mismo paciente se auto-aplicaba la corriente eléctrica ("*cure yourself by electricity*"). Sin embargo, cuando la electricidad llegó a los hogares (1910), la batería se volvió algo anticuada y fue poco a poco desapareciendo. Durante la primera Guerra Mundial, las escuelas de medicina eliminaron la electroterapia de los planes de estudio, y aproximadamente en 1920,

la técnica había sido marginada, debido a la gran charlatanería en que se había convertido y de los grandes avances en la psicología y el psicoanálisis (18).

Sin embargo, pocos años después (1930) *Bini* y *Cerletti* traen un nuevo tipo de electroterapia, la terapia electroconvulsiva (TEC) mediante la cual inducían convulsiones en los pacientes a través del estímulo eléctrico. Esta técnica se diferencia de la aplicada por *Aldini* y seguidores debido a que la TEC produce actividad convulsiva mientras que la previa produce polarización cerebral, es decir, buscan inducir cambios fisiológicos que modulan la función cerebral (17). En las primeras dos o tres décadas de uso, la TEC se administró a pacientes sin anestesia, y posteriormente, se fueron realizando bajo anestesia. Sin embargo, esta técnica, aunque sigue siendo aplicada en la actualidad en menor proporción, produce efectos secundarios graves e irreversibles, con pérdida de la memoria. No obstante, algunos científicos siguen afirmando que la TEC es inofensiva (20).

En la década de los 60, la DC tuvo un breve regreso y sus efectos fueron por fin investigados sistemáticamente. Se pudo demostrar que la corriente continua puede afectar las funciones cerebrales a través de la modulación de la excitabilidad cortical (21,22). Sin embargo, fue otra vez abandonada debido al progreso logrado en el tratamiento de los trastornos psiquiátricos con drogas (17). A finales del siglo XX y comienzo del siglo XXI, los estudios acerca de la DC fueron más concluyentes y se pudo afirmar que la DC con frecuencias bajas traspasa el cuero cabelludo e influye en la actividad cerebral. Cuando la intensidad utilizada es relativamente fuerte (1 – 1.5 mA) y es aplicada por un período de más de 10 minutos, la DC puede ser utilizada para el tratamiento de trastornos mentales y conductuales (17).

ELECTROESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR

Anatomía y Fisiología del Sistema Músculo Esquelético

El sistema músculo esquelético es el sistema responsable de todos los movimientos rápidos y voluntarios del cuerpo y es controlado por el sistema nervioso central (SNC). La activación de este sistema se basa en el control voluntario, permitiendo la ejecución de movimientos corporales más finos o más groseros (23).

Los músculos están controlados por *motoneuronas α*, que son neuronas colinérgicas cuyo soma se encuentra en el asta anterior de la médula espinal y en los núcleos motores de los pares craneales. El conjunto formado por una motoneurona α y las fibras musculares que inerva constituyen una unidad funcional y se denomina *unidad motora*. Cada fibra muscular es inervada por una sola motoneurona, sin embargo, el axón de la motoneurona puede inervar varias fibras musculares (24) (Figura 4).

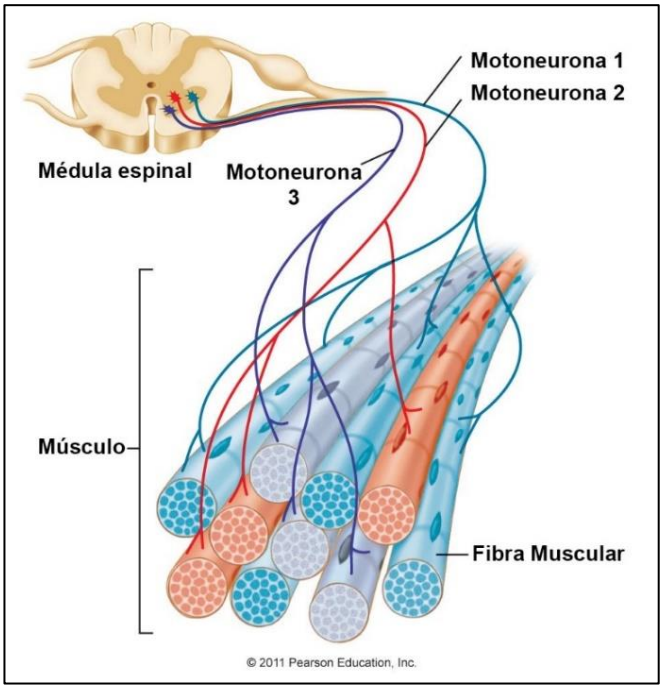

Figura 4: Inervación de las fibras musculares. Unidades Motoras. Ilustración obtenida y adaptada del internet (165)

Cada fibra muscular está constituida por cientos o miles de miofribillas, y cada miofibrilla está formada por aproximadamente 1.500 filamentos gruesos de miosina y 3.000 filamentos delgados de actina adyacentes entre sí. La miosina y la actina son las responsables de la contracción muscular y son la principal composición proteica del *sarcómero* (Figura 5).

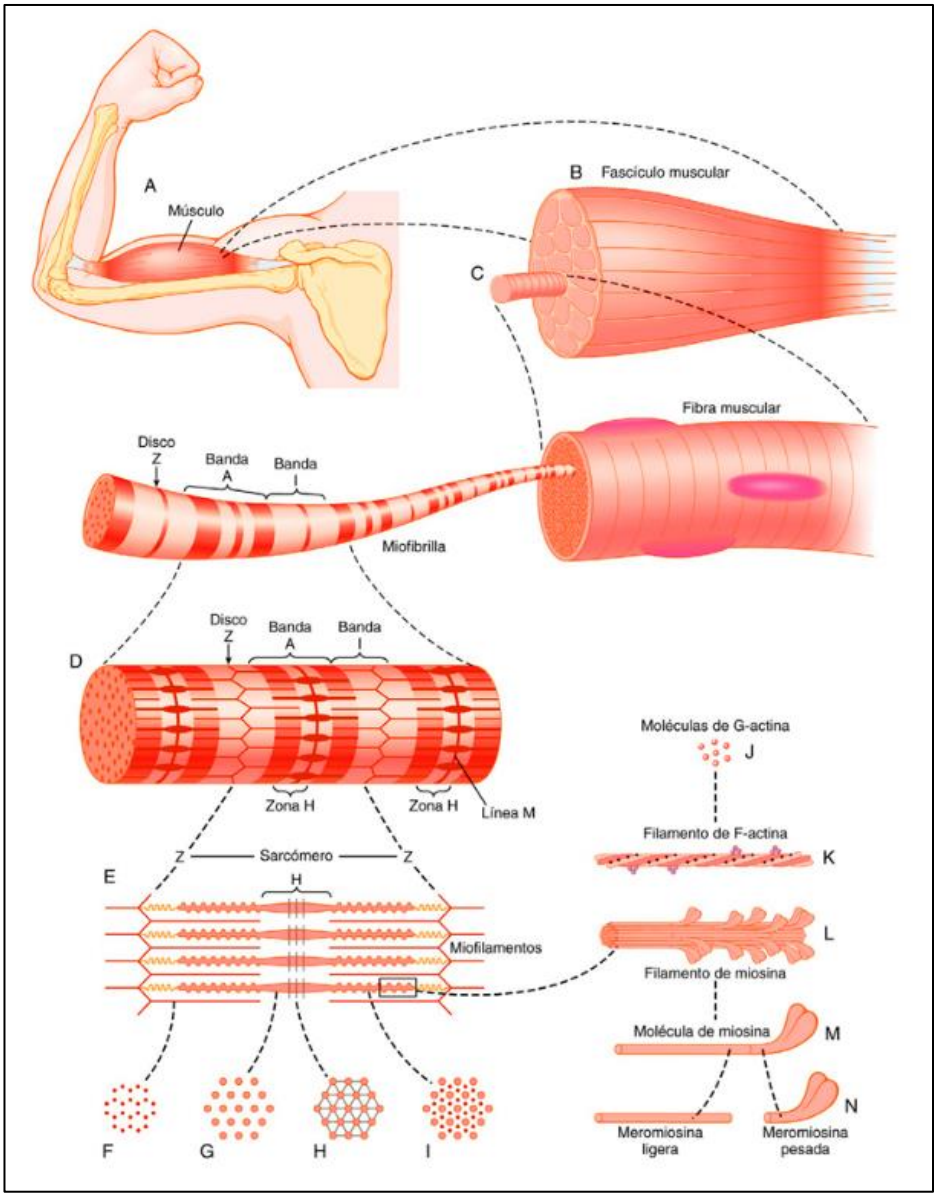

Figura 5: Organización del músculo esquelético. Vista macroscópica y molecular del músculo esquelético. Ilustración obtenida y adaptada de Guyton y Hall (25).

La contracción muscular es el proceso fisiológico en el que los músculos se acortan o se estiran (o que, en algunas ocasiones, permanecen con la misma longitud) como consecuencia de un estímulo previo. Y ocurre cuando la cabeza de la miosina se ancla a la actina y se produce un desplazamiento de los filamentos.

La molécula de miosina está formada por seis cadenas polipeptídicas, dos *cadenas pesadas de miosina* (MHC, por su sigla en inglés *Myosin Heavy Chain*), y cuatro cadenas ligeras. La contracción ocurre cuando las proyecciones de los filamentos de miosina (cabeza de la miosina), interaccionan con los filamentos de actina que están unidos en uno de sus extremos al *disco Z* y forman los *puentes cruzados* (Figura 5 – L). El disco Z está formado por proteínas filamentosas que atraviesan las miofibrillas, uniéndolas entre sí a lo largo de toda la longitud de la fibra muscular. El sarcómero está situado en una porción de la miofibrilla, entre dos discos Z sucesivos. Cuando la fibra muscular está contraída, la longitud del sarcómero se acorta hasta aproximadamente 2 µm, y cuando alcanza está longitud los filamentos de actina se superponen a los de miosina y el músculo es capaz de producir su máxima fuerza de contracción.

Entre las miofibrillas hay un espacio lleno de un líquido intracelular que contiene grandes cantidades de potasio, magnesio, fosfato y enzimas proteicas, denominado *sarcoplasma*. Paralelas a las miofibrillas están las *mitocondrias*; ellas proporcionan a las miofibrillas durante las contracciones una gran cantidad de energía en forma de *trifosfato de adenosina* (ATP) (25).

Finalmente, la contracción muscular se produce cuando un potencial de acción viaja a lo largo de una fibra nerviosa motora hasta sus terminales. Las unidades motoras son el brazo eferente del SNC, y su activación implica la propagación de potenciales de acción desde el axón de las motoneuronas α. Este axón finaliza en un botón terminal que penetra en los surcos formados por la membrana de la célula muscular, o sarcolema, formando la placa neuromuscular. Los potenciales de acción del nervio

abren los canales de calcio voltaje-dependiente del en la membrana presináptica e inicia un flujo de entrada de calcio al botón terminal permitiendo la liberación de acetilcolina (Ach). Al difundirse a través del espacio entre el botón terminal y la membrana muscular, la Ach induce la despolarización de la placa generando un potencial de placa terminal. El potencial de placa genera un potencial de acción en el sarcolema que se propaga a lo largo de la membrana de la superficie del músculo permitiendo la activación casi simultánea de toda la célula muscular (24,25).

Cuando una motoneurona genera un potencial de acción, todas las fibras musculares que inerva se contraen. Un único potencial de acción es capaz de producir una sola contracción muscular de aproximadamente 100 ms de duración (25).

La cantidad de fibras que inerva cada motoneurona varía según la función que desarrolla el músculo inervado. Es decir, los músculos responsables de movimientos más finos reciben menos activación de fibras por parte de su motoneurona, mientras que los músculos que realizan movimientos más bruscos necesitan mayor reclutamiento de fibras musculares. Esta contracción ocurre de forma asincrónica, debido a que las fibras que inerva cada motoneurona no están necesariamente juntas, sino que están intercaladas con las fibras inervadas por otras motoneuronas a lo largo del músculo. Esta organización permite que cuando unas fibras musculares se relajan otras puedan contraerse, y de esta forma la contracción muscular ocurre por todo el músculo de manera sostenida (26).

Las isoformas de la MHC son las principales proteínas contráctiles del músculo esquelético y son las que determinan sus propiedades funcionales como velocidad de contracción, pico de potencia o velocidad de desarrollo de fuerza. En general, los músculos de la mayoría de los mamíferos adultos poseen 4 isoformas principales de MHC: una isoforma lenta (MHCI) y otras tres rápidas (MHCIIA, MHCIIX, MHCIIB) (27-29). Sin embargo, la musculatura esquelética humana no posee la isoforma

MHCIIB (27,28,30). Las fibras que expresan MHCI son las denominadas fibras tipo I, mientras que las fibras que expresan MHCIIA, MHCIIX y MHCIIB son denominadas tipo IIA, IIX y IIB respectivamente. De forma añadida, también se ha confirmado la presencia de la expresión hibrida de las isoformas (I/IIA, IIA/IIX, IIX/IIB) (27,29,30).

La fibra muscular también puede ser clasificada según a su velocidad de contracción y su capacidad oxidativa, y están asociadas directamente con su isoforma de MHC (28,31). Las fibras de contracción lenta (tipo I) o rojas, son altamente oxidativas, tienen un menor tamaño, están inervadas por nervios de menor diámetro y tienen altas concentraciones de mioglobina y mitocondrias para la producción de energía por la vía oxidativa (28,29). Por otro lado, las fibras de contracción rápida (tipo II) también son consideradas fibras blancas y poseen menor cantidad de enzimas oxidativas, menor volumen de mitocondrias y gran actividad de enzimas glucolíticas, permitiendo la producción rápida de energía; presentan un mayor área de sección transversal (CSA, por su sigla en inglés *Cross-Sectional Area*) e implican una contracción muscular más rápida y potente. Como se deriva de lo ya expuesto, las fibras tipo II se pueden subclasificar en IIA, IIB, IIX. En contraste con las fibras musculares de ratas y ratones, las fibras IIX humanas presentan un nivel más bajo de metabolismo oxidativo en comparación con las demás fibras (29) (ver **Tabla 1**).

Tabla 1.
Tipos de fibras musculares de mamíferos y características

Características	**Tipos de fibras**			
MHC	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIX	Tipo IIB*
Velocidad de contracción	Lenta	Rápida	Rápida	Rápida
Metabolismo	Oxidativo	Oxidativo	Intermedio	Glucolítico
Resistencia a la fatiga	Resistente	Resistente	Intermedia	Poco resistente

*No está presente en humanos. MHC: Cadena pesada de la miosina (*Miosin Heavy Chain*)

Estimulación Eléctrica del Músculo

La electroestimulación muscular transcutánea o estimulación neuromuscular (NMES, por su sigla en inglés *Neuromuscular Electrical Stimulation*) consiste en la contracción muscular inducida por un estímulo eléctrico (EE) aplicado a través de electrodos de superficie (32). Posee varias aplicaciones, algunas ya mencionadas anteriormente, así como la prevención y tratamiento de la atrofia por desuso, la reeducación muscular y tratamiento del edema (33,34).

En este tipo de contracción muscular se activan las unidades motoras más cercanas al estímulo y más superficiales. Para que se activen un mayor número de motoneuronas y se produzca una mayor contracción muscular, la corriente deberá ser aplicada lo más cerca posible del nervio que inerva el músculo (11), por lo que es necesario aplicar la máxima intensidad tolerada por el individuo para activar las fibras más profundas (35).

Durante la contracción voluntaria, el reclutamiento de las unidades motoras ocurre siguiendo el principio de tamaño descrito por Henneman y colaboradores (36), donde las unidades motoras con un umbral de reclutamiento bajo se componen de fibras musculares de contracción lenta, mientras que las unidades con un umbral de reclutamiento alto contienen fibras de contracción rápida. En condiciones fisiológicas, las unidades motoras se activan por corrientes sinápticas generadas en la motoneurona, y debido a que las motoneuronas pequeñas presentan mayor resistencia de entrada, experimentan un mayor cambio en el potencial de membrana para una corriente sináptica dada y, por lo tanto, alcanzan el umbral de descarga del potencial de acción con corrientes sinápticas menores, motivo por el cual son reclutadas más fácilmente (34). Por el contrario, en la contracción muscular por un estímulo eléctrico externo, el reclutamiento de las unidades motoras ocurre de manera no selectiva y/o desordenada (26,37). Esto ocurre porque existe una relación inversa entre el diámetro del axón y la resistencia axial, que permite el flujo

de corriente a lo largo del axón, al producir una corriente transmembrana más baja en los axones de gran diámetro (34,38). Además, los axones nerviosos se activan directamente, por lo que aquellos que están más cerca del campo eléctrico son reclutados más fácilmente que los más profundos en la masa muscular (26,39). En otras palabras, el patrón de reclutamiento de las unidades motoras por estimulación eléctrica dependerá de la resistencia de entrada del axón, de la anatomía muscular y nerviosa, y de la intensidad de corriente aplicada (34). Otra característica de la contracción por estimulación eléctrica es que las unidades motoras se despolarizan al mismo tiempo, dando lugar a una contracción sincrónica (40). Eso hace que la contracción provocada por estimulación eléctrica sea más fatigante que la contracción voluntaria, debido a que no hay unidades motoras inactivas que puedan sustituir a las activas cuando éstas se fatigan (26).

Lewek (41) sugiere que este reclutamiento “desordenado” proporciona medios más efectivos para aumentar la fuerza muscular que los programas tradicionales de fortalecimiento, incluso a niveles relativamente bajos de fuerza evocada. Por el contrario, otros autores creen que la activación no fisiológica por medio de la NMES, puede ser la mejor estrategia para conseguir una buena rehabilitación (42) debido a que permite que las contracciones musculares sean siempre idénticas y máximas (43).

Parámetros de la Estimulación Eléctrica

A la hora de aplicar una corriente excitomotora, existen diferentes parámetros que podemos seleccionar. Los parámetros son elegidos según los objetivos que se desean alcanzar, además, es importante que la corriente sea confortable, segura y eficaz.

Tipos de corriente utilizadas en la NMES:

Existen muchos tipos de corrientes que producen efecto excitomotor, como las corrientes con ondas rectangulares monofásicas, rectangulares bifásicas, simétricas y asimétricas y las sinusoidales bifásicas simétricas (corrientes de baja frecuencia) (44). La onda rectangular, bifásica y simétrica es la más documentada y la que parece producir una mayor fuerza de contracción y una menor fatiga, comparadas a las demás corrientes (34,44)

Duración de impulso:

Es determinada por la cronaxia que determina el tiempo mínimo que una fibra nerviosa necesita para ser estimulada. La cronaxia varía para cada músculo e incluso para cada individuo, de esta manera lo más frecuente es seleccionar un tiempo de estímulo aproximado, donde la duración de impulso de 300 µs es la más aceptada y utilizada (34)

Frecuencia:

Es el número de veces en que se repite la onda eléctrica en un segundo, y su unidad de medida es el Hz, y es considerado el parámetro terapéutico más importante (45). Las corrientes de baja frecuencia son las que están por debajo de 40 Hz y tienen como principal objetivo la recuperación, capilarización u oxigenación del músculo. Por encima de 40 Hz las corrientes son consideradas de alta frecuencia y su principal objetivo es mejorar la fuerza muscular (44).

Es posible describir el efecto sobre el músculo, dependiendo de la frecuencia de estimulación utilizada (2):

–De 10 a 33 Hz: Reclutamiento preferente de las fibras tipo I. Se aumenta la resistencia de las fibras y puede producir una transformación de las fibras tipo I en fibras tipo IIA.

–De 33 a 50 Hz: Se estimulan fibras intermedias tipo IIA incrementándose la resistencia a la fatiga.

–De 50 a 75 Hz: Reclutamiento de fibras rápidas o tipo IIX y IIB aumentando la fuerza y la resistencia muscular.

–De 75 a 150 Hz: Supertetanización de las fibras rápidas. Se mejoran las manifestaciones reactivas de la fuerza y permite realizar contracciones musculares máximas.

En base a esta información, Gorgey (46) encontró que existe una clara relación entre la frecuencia de corriente utilizada, la fuerza y la fatiga muscular provocada.

Intensidad de la corriente:

Es la cantidad de corriente que pasa por un conductor, su unidad de medida es el amperio. Cuanto mayor sea la intensidad de corriente utilizada más unidades motoras serán reclutadas y se supone, que más fuerza muscular será generada. Sin embargo, una mayor intensidad de corriente es menos tolerable, puesto que a altas intensidades se estimulan también fibras nociceptivas (40,47). En estudios con humanos, se describe que la intensidad habitual para producir una contracción muscular oscila entre 20 – 80 mA. Además, las fibras nerviosas son capaces de adaptarse a los estímulos continuos, así, la intensidad debe ser reajustada durante la sesión para que el músculo no pierda la capacidad de producir las contracciones (48,49).

Tiempo de contracción y relajación:

El tiempo de contracción muscular es el tiempo que dura el tren de estímulos eléctricos, que suele prolongarse entre 6 a 15 segundos. Entre cada contracción es necesario que haya un restablecimiento del potencial de membrana de la fibra muscular, es decir, la fibra muscular necesita un tiempo de reposo para que ocurra su recuperación fisiológica. Este tiempo de reposo debe ser como mínimo el doble del tiempo de contracción (44,50).

Efectos de la Electroestimulación Neuromuscular:

Varios estudios demuestran que el entrenamiento físico produce cambios en la actividad neuromuscular, en el metabolismo energético, así como en las repuestas hormonales. De manera similar al ejercicio voluntario, la electroestimulación muscular a largo plazo también ha demostrado producir cambios sobre la musculatura, tales como:

- Activación neuromuscular: suele ocurrir antes incluso que los cambios estructurales adaptativos del tejido muscular (51,52)

- Aumento del flujo sanguíneo (47)

- Hipertrofia y aumento del área de sección trasversal (44,51,52)

- Aumento de la fuerza muscular (34,44,51-53)

- Cambios en la proporción de las fibras musculares y composición de las isoformas de MHC (51,52,54)

Sin embargo, estos cambios son dependientes del tipo de entrenamiento, grupos musculares y metabolismo energético (54). Además, cada músculo tiene un “rango

adaptativo” de posibles transformaciones en respuesta a diferentes patrones de actividad (55).

ELECTROESTIMULACIÓN TRANSCRANEAL

La Corteza Cerebral

La corteza cerebral es la parte más nueva (evolutivamente) y la más desarrollada del cerebro. Es la región donde están representadas las funciones neuronales y psíquicas más complejas (56).

Es una delgada capa de materia gris (somas neuronales) que recubre la materia blanca o medular (axones neuronales) del cerebro. Está fuertemente circunvolucionada y posee unos 10.000 millones de neuronas con cerca de 50 trillones de sinapsis. A la corteza llegan los impulsos de todas las vías sensoriales y es donde se vuelven conscientes y son interpretadas. De ella también, salen impulsos nerviosos que inician y generan los movimientos voluntarios. Además, la corteza cerebral constituye el origen de todos procesos psicológicos descritos (57).

Las circunvoluciones tienen giros y surcos (fisuras), los surcos más pronunciados y más largos son usados como límites para la división de la corteza en lóbulos (Figura 6), dentro de cada hemisferio cerebral (derecho e izquierdo). Los lóbulos han sido denominados de acuerdo con el hueso que lo recubre, desde un punto de vista anatómico. De forma grosera, podríamos definir funciones asociadas a cada lóbulo cerebral:

- Lóbulo frontal: situado en la parte anterior, es responsable del control motor, el razonamiento y resolución de problemas, parte del lenguaje y emociones.

- Lóbulo parietal: responsable de las percepciones somatosensoriales.

- Lóbulo occipital: recibe información visual y es responsable del procesamiento de imágenes.

- Lóbulo temporal: encargado de la audición, equilibrio y coordinación.

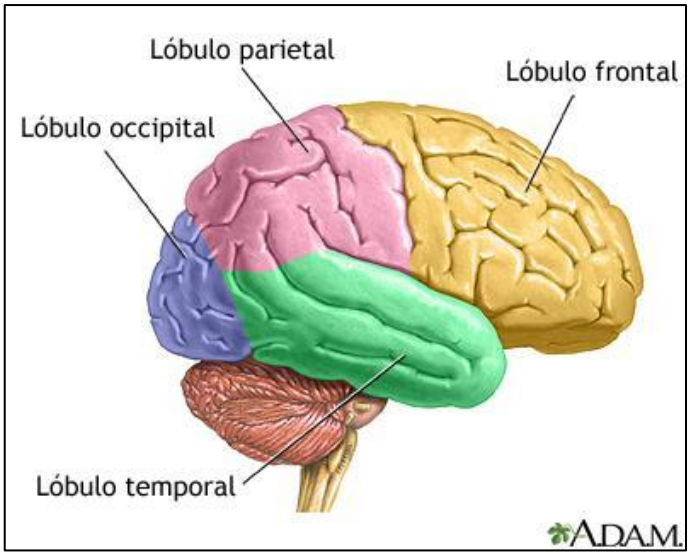

Figura 6: Lóbulos cerebrales (58)

Los dos hemisferios cerebrales están conectados entre sí por una estructura, el cuerpo calloso. El hemisferio izquierdo está relacionado con la parte derecha del cuerpo y con funciones como el lenguaje, cálculos y lógica. Mientras que, el hemisferio derecho está relacionado con la parte izquierda del cuerpo y con funciones tales como la orientación espacial, reconocimiento de caras, y la imagen corporal (23) (Figura 7).

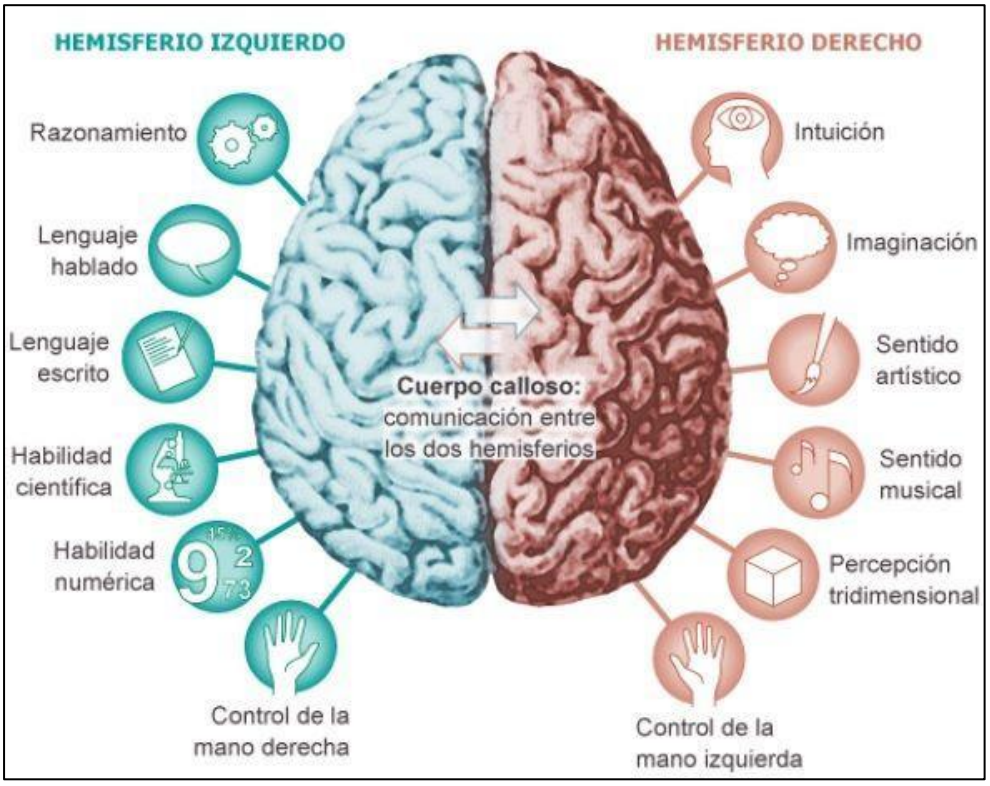

Figura 7: La corteza cerebral, especialización de los hemisferios. Representación hemisférica de las funciones cerebrales, como índice de lateralización de la función cerebral. Imagen obtenida y adaptada del internet (59)

El sistema nervioso está compuesto por innumerables células capaces de transmitir señales bioeléctricas, las *neuronas*, y de ellas dependen las características de la transmisión nerviosa. Existen neuronas capaces de integrar la información y convertirla en patrones de descarga de potenciales de acción, mientras que hay otras neuronas con actividad bioeléctrica propia, sobre las cuales la información aferente actúa modulando ese patrón de descarga. Los contactos neuronales o *sinapsis* permiten el flujo y transferencia de información entre neuronas, siendo las sinapsis químicas (utilizan neurotransmisores) las más comunes (23).

En el periodo postnatal, las sinapsis se crean a un ritmo rápido, alcanzando a los dos años una densidad que llega al doble que en adultos. A partir de esta edad, las sinapsis neuronales comenzarán a decrecer. Este proceso de proliferación y poda

de sinapsis parece estar bajo el control tanto de programas intrínsecos como de influencias ambientales. El equilibrio de actividad entre las sinapsis excitadoras que utilizan preferentemente glutamato como neurotransmisor y las sinapsis inhibitorias que usan también preferentemente ácido γ-aminobutírico (GABA), influye en la estabilización de las sinapsis y los circuitos neuronales (60).

La corteza cerebral presenta múltiples interacciones consigo misma y con el resto del SNC. Este sistema de proyecciones participa en los mecanismos de control y ejecución motora, actividades emocionales y cognitivas. Además, estas proyecciones permiten interacciones que garantizan el control de funciones complejas como el estado ánimo, la motivación, la conciencia, el pensamiento, el lenguaje y otras, así como la percepción, control y ejecución de los movimientos motores voluntarios (61). Las áreas neocorticales que no son parte de los sistemas sensoriales o motores se denominan cortezas asociativas o cortezas de alto orden (23).

En particular, la corteza prefrontal realiza un control supramodal sobre las funciones mentales a través de las funciones ejecutivas, como es el caso de la autoconciencia o autoanálisis. Este autoanálisis controla la propia actividad mental y utiliza el conocimiento previo para resolver nuevos problemas y guiar la toma de decisiones. También hay un control ejecutivo en funciones como anticipación, formulación y planificación de posibles soluciones e iniciación de la respuesta, bien como control de actividades más complejas como el hecho de iniciar y mantener una actividad mental mientras desarrolla una conducta motora (62). La corteza prefrontal está formada por tres componentes: 1) corteza prefrontal dorsolateral que participa en mecanismos de memoria y aprendizaje, planificación y toma de decisiones; 2) corteza orbitofrontal que desempeña un papel importante en el control de las respuestas emocionales; y, 3) corteza prefrontal medial que está involucrada en la atención. Conjuntamente, la corteza prefrontal es también importante en la inhibición de conductas indeseadas (23).

Además de todo eso, el SNC presenta una capacidad biológica para madurar, cambiar estructural y funcionalmente en respuesta a la experiencia y adaptarse después de una lesión. A esta capacidad es conocida como *neuroplasticidad*. Esto se logra principalmente mediante la modulación de los mecanismos genéticos, moleculares y celulares que influyen directa o indirectamente en la dinámica de las conexiones sinápticas y la formación de nuevos circuitos neuronales (60,63).

Estimulación Transcraneal por Corriente Directa (tDCS)

La tDCS es una técnica no farmacológica y no invasiva utilizada para la modulación de la excitabilidad de la corteza cerebral por medio de corriente eléctrica aplicada a través del cráneo. Además, es un método que permite estimular la corteza cerebral sin la necesidad de manipulación quirúrgica ni penetración transcraneal (64).

La tDCS consiste en la aplicación de corriente eléctrica continua. Se aplican corrientes anódicas y/o catódicas débiles, pero que son capaces de reducir o mejorar selectivamente la excitabilidad cerebral. Sus efectos pueden prolongarse por algunos minutos después de finalizar la estimulación. La estimulación anódica precedida por la estimulación catódica puede producir cambios en la amplitud de los potenciales evocados (65,66). En otras palabras, se puede decir que la tDCS puede inducir la neuroplasticidad (67).

Muchos son los campos de exploración de la modulación cortical a través de la tDCS: en el lenguaje, percepción sensorial, toma de decisiones, memoria, dolor emocional, procesos cognitivos y dolor crónico (64)

Parámetros de la tDCS

Los parámetros de la tDCS pueden variar ampliamente, desde el tamaño del electrodo hasta la intensidad del estímulo, y todo estará relacionado con los efectos fisiológicos que se desea obtener.

Densidad e intensidad de la corriente:

Habitualmente se aplica una baja intensidad de corriente que varía entre los 0.5 mA y los 2 mA, intensidad suficiente para producir efectos a nivel cortical (64,68). Sin embargo, debido a que la corriente siempre tiende a fluir por el camino de menor resistencia, hay una derivación sustancial de corriente en el cuero cabelludo. Sabiendo esto, la densidad de la corriente (cantidad de corriente por unidad de área que pasa a través de un conductor) juega un papel crucial para determinar si la corriente aplicada realmente penetra el cráneo y alcanza la corteza cerebral (64). De este modo, cuanto más alta sea la densidad de la corriente, mayor profundidad del campo eléctrico. No obstante, al aumentar la densidad de la corriente, la tDCS puede ser dolorosa. Por esta razón, se vuelve más efectivo aumentar el tiempo de duración del estímulo en lugar de la densidad (69). El uso de densidades entre los 0.08 y 0.20 A/m^2 es lo que determina que la tDCS sea estrictamente neuromoduladora, ya que estos niveles de densidad no son capaces de generar directamente potenciales de acción en las neuronas subyacentes (64,66,68).

Tiempo de estímulo:

La duración de la plasticidad inducida por la tDCS está relacionada con la duración del estímulo, es decir es tiempo dependiente (66,70). No obstante, estímulos prolongados pueden producir como efecto una saturación. Para evitar el efecto de saturación e inducir cambios significativos a nivel cortical y sináptico, se requiere la

realización de múltiples sesiones. Una segunda sesión realizada aún bajo los efectos de la primera sesión es adecuada para prolongar y mejorar la magnitud de la excitabilidad inducida por la tDCS (70). También es cierto que cuanto mayor sea el tiempo del estímulo, mayor la posibilidad de efectos secundarios prolongados, sin embargo, se observan mejores efectos en la excitabilidad a largo plazo. Cuando se persiguen unos objetivos clínicos, es importante que los efectos sean lo más duraderos posible (69). El líneas generales, un tiempo de estimulación medio suele durar 20 minutos (68,71,72)

Polaridad de la estimulación:

La tDCS modula la actividad cerebral espontánea de una manera dependiente de la polaridad. Por lo tanto, se cree que la tDCS produce sus efectos al polarizar el tejido cerebral. Para conseguir el aumento de la excitabilidad cortical se aplica tDCS anódica, mientras que la tDCS catódica disminuye la excitabilidad (64,73). Sin embargo, la dirección de polarización depende estrictamente de la orientación de los axones y dendritas en el campo eléctrico inducido (64).

Disposición y tamaño de los electrodos:

La posición de los electrodos es lo que delimita la distribución espacial y la dirección del flujo de la corriente, factores que determinan los resultados y efectividad de la estimulación. Estudios de imagen realizados de forma simultánea a la aplicación de tDCS demuestran que los efectos de polarización están generalmente restringidos al área debajo de los electrodos (74). Normalmente se utiliza un electrodo anódico y/o un catódico dispuesto sobre el cuero cabelludo para modular un área en particular de la corteza cerebral. La posición generalmente está determinada según el Sistema Internacional *EEG 10-20* para la colocación de electrodos extracraneales. Por ejemplo, para estimular el sistema visual, los electrodos suelen estar colocados sobre las zonas O1 u O2 (Figura 8) (69,75).

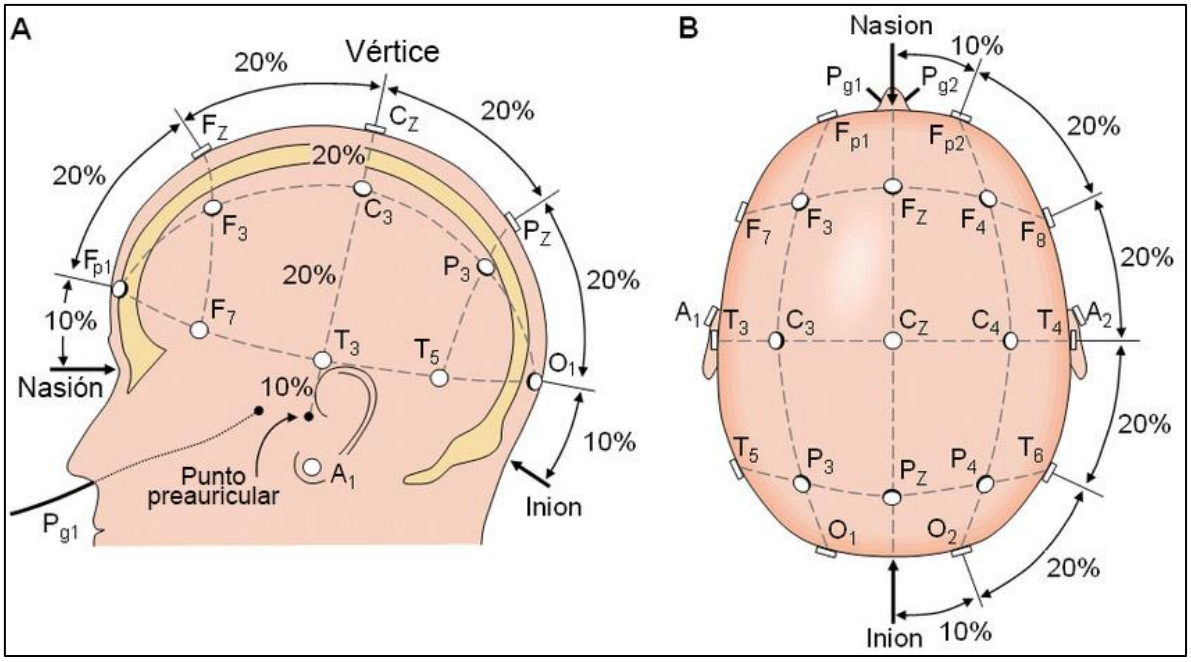

Figura 8: Sistema Internacional 10-20 para la colocación de los electrodos extracraneales. (A, B) Las letras señalan el área (Fp, prefrontal; F, frontal; C, central; P, parietal; T, temporal y O, occipital), mientras que los números distinguen el hemisferio (pares del derecho, impares del izquierdo) y la línea media se señala con una “z”; por lo que Fz se encuentra frontalmente en la línea media (76).

Con relación al tamaño de los electrodos, se ha demostrado que no presenta un impacto clínico significativo. Sin embargo, sí se ha observado que, al aumentar el tamaño del electrodo, la densidad máxima de corriente se ve disminuida. Los electrodos de 25 – 35 cm^2 son los más utilizados (77).

Efectos secundarios

En general, la tDCS es una técnica segura con efectos adversos leves y transitorios (78). Los efectos adversos más comunes cuando se administra corriente continua débil (entre 1 y 2 mA) pueden consistir en una leve sensación de hormigueo y/o comezón debajo de los electrodos durante los primeros segundos de estimulación, o bien la sensación de destello de luz si el estímulo se enciende o se apagaba abruptamente, así como la sensación de calor debajo de los electrodos. También

se ha descrito un eritema cutáneo (enrojecimiento), que suele desaparecer después de la tDCS (68,78,79).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El presente trabajo ha intentado documentar hasta qué punto la estimulación eléctrica aplicada a la fisioterapia puede constituir una terapia física efectiva tanto a nivel periférico para la consecución de efectos beneficiosos en la función neuromuscular, como a nivel central para la consecución de una mejora en aspectos motivacionales y conductuales.

Múltiples trabajos han podido documentar desde una perspectiva fisiológica los efectos de la electroestimulación de alta frecuencia en el sistema neuromuscular, sin embargo, son escasos los estudios que observan cambios en las propiedades contráctiles y moleculares, y en la capacidad angiogénica y miogénica del músculo estriado tras un protocolo electroestimulación de alta frecuencia. Así mismo, también son escasos los estudios científicos sobre los cambios motivacionales y conductuales tras estimulación mediante tDCS.

En este sentido, se plantea como **hipótesis** que la electroestimulación neuromuscular como técnica fisioterapéutica es capaz de producir cambios estructurales a nivel celular y molecular en el músculo estimulado. Así mismo, planteamos como hipótesis que la estimulación transcraneal con corriente continua es capaz de producir cambios conductuales, y por tanto aplicable a procesos terapéuticos como la terapia de la obesidad.

Para intentar demostrar nuestras hipótesis nos planteamos una serie de objetivos generales y específicos.

OBJETIVOS

Generales:

- Evidenciar que la estimulación eléctrica muscular de alta frecuencia, inducida experimentalmente (electroestimulación neuromuscular – NMES), puede producir una hipertrofia muscular y mejora en el rendimiento muscular.

- Llevar a cabo un estudio de estimulación de corriente continua transcraneal (tDCS) sobre la corteza prefrontal con el propósito de favorecer la pérdida de peso.

Específicos:

- Verificar si se producen cambios en las propiedades contráctiles del musculo tibial anterior en un modelo experimental de ratón, después de 15 sesiones de electroestimulación neuromuscular

- Analizar si la electroestimulación neuromuscular produce cambios en el fenotipo de las fibras musculares

- Observar si la electroestimulación neuromuscular es capaz de estimular cambios miogénicos y angiogénicos a nivel histológico y/o molecular

- Analizar si el estímulo con tDCS a lo largo de 4 semanas asociado a una dieta hipocalórica produce pérdida de peso en comparación con su placebo.

- Identificar si la tDCS es capaz de inducir cambios en la motivación y conducta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de Tesis Doctoral incluye dos estudios independientes: un estudio experimental con modelo animal; y un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego. Ambos fueron desarrollados en la Facultad de Medicina – Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá – y demuestran posibles aplicaciones de la electroestimulación en Fisioterapia.

En el estudio con animales, se analizaron los cambios funcionales y morfológicos del músculo tibial anterior de ratones tras 15 sesiones de electroestimulación de alta frecuencia.

En el ensayo clínico se analizaron los cambios en la motivación y conducta alimentaria tras 8 sesiones de estimulación mediante tDCS.

ESTUDIO DE ESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para este estudio se ha utilizado el ratón como animal de experimentación, debido a que queríamos controlar con precisión las condiciones ambientales, nutricionales y de actividades motora de los sujetos de experimentación. Además, este tipo de población nos da la posibilidad de diseccionar el músculo y estudiar los cambios morfológicos e histológicos en todo el músculo no solo en una pequeña muestra, como lo que ocurre en estudios llevados a cabo en humanos (80).

Un total de 26 ratones macho de fenotipo C57BL/6J, de aproximadamente 6 meses de vida, fueron utilizados en este estudio. Fueron adquiridos de los laboratorios Jackson (www.jax.org) y estabulados en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá. Estuvieron estabulados en racks ventilados, con jaulas independientes, ultrafiltración de aire de entrada y salida a través de filtros HEPA (por sus siglas en inglés de *High Efficiency Particulate Air*) absolutos de una eficiencia de 99,997% (filtra las partículas < 0.3 µm). La temperatura de mantenimiento era de 21 ± 1º C, la humedad relativa del aire de 55±10%, y la

ventilación de > 30 renovaciones/hora. Los animales tuvieron acceso a bebida y comida *ad libitum*, con pienso A04 de mantenimiento de rata/ratón de la empresa Panlab, y el lecho era de madera de chopo. Durante la estabulación, los animales fueron sometidos a un ciclo luz/oscuridad de 12:12 horas. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia.

El Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá cumple en todos sus extremos las recomendaciones del Convenio del Consejo de Europa ETS 123 y la normativa vigente sobre Protección de los Animales utilizados en Experimentación y otros Fines Científicos, reflejada en el R.D. 1201/2005, de 10 de Octubre de 2005. Asimismo, dicho Centro se encuentra registrado en la Dirección General de Agricultura de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid, con el número ES280050001165.

Todos los procedimientos utilizados para la realización de este estudio siguieron los principios éticos para las investigaciones y experimentos con animales, de acuerdo con las Directrices Europeas de Cuidado de Animales de Laboratorio y fueron aceptados por el Comité de Ética y Experimentación con Animal de la Universidad de Alcalá (expediente CEI-UAH-AN2016008 // PROEX 143/17).

Grupo Experimental

Diecisiete ratones (n=17) recibieron 15 sesiones de electroestimulación neuromuscular (NMES) de alta frecuencia del compartimiento muscular anterior (tibial anterior y extensor largo de los dedos) de la pata izquierda. Se realizaron 3 sesiones por semana en días alternos. La NMES se aplicó en una sola pata para reducir el tiempo de anestesia.

El protocolo de NMES fue adaptado de los estudios de Ambrosio (81) y Distefano (82) y colaboradores, que consisía en 3 series de 10 repeticiones con una frecuencia de 100 Hz, duración de pulso de 4 milisegundos, tiempo de contracción de 5 s,

tiempo de relajación de 10 segundos, y 5 min de descanso entre cada serie. Los ratones eran posicionados en decúbito semilateral, con flexión de rodilla y de cadera de aproximadamente 90º. Se utilizaron electrodos de superficie de hilo de cobre conectados a un electroestimulador *PowerLab* 4/35 (A/D conversor, AD Instruments, UK) con un software (*LabChart, AD Instruments, UK*). Los electrodos fueron dispuestos de forma superficial sobre la región del nervio peroneo común (localizado en la cabeza anterior del peroné). El movimiento de dorsiflexión de tobillo y extensión de los dedos certificaba el posicionamiento correcto de los electrodos sobre el nervio (Figura 9). Durante todo el proceso de NMES, los ratones permanecieron anestesiados con isoflurano inhalatorio (dosis de inducción 4-5% y 2% para mantenimiento) y O_2 con flujo de 0,3 L/min.

Figura 9: Ilustración del posicionamiento y disposición de los electrodos durante las sesiones de NMES. **(A)** Fotografías de la disposición del animal y los electrodos de estimulación; **(B)** Electroestimulador utilizado

Grupo Control

Nueve ratones (n=9) fueron asignados a este grupo y sirvieron de control. Estos ratones no recibieron ningún tipo de intervención.

Variables del Estudio

Los valores de pre-intervención fueron medidos solamente en el grupo control y sirvió de referencia para el grupo experimental, pero todos los análisis post-intervención fueron realizados de igual forma en los dos grupos (control y experimental). Las mediciones para el grupo experimental fueron realizadas tras 48 horas desde la última sesión de NMES. Las variables analizadas incluyeron:

Variables funcionales

A través de pruebas funcionales se analizaron las propiedades contráctiles, incluyendo la máxima fuerza tetánica y la fatiga muscular.

Pruebas Funcionales: De los 17 ratones sometidos a NMES, 8 fueron seleccionados al azar para el análisis de las propiedades contráctiles del músculo TA. Mientras que, en el grupo control, 5 ratones fueron utilizados para el análisis de dichas propiedades (Figura 10).

La medición se realizó *in situ* con los ratones bajo anestesia inhalatoria (misma dosis de inducción y mantenimiento citadas anteriormente). La pérdida del reflejo podal marcó el inicio del procedimiento. Los ratones fueron posicionados en decúbito semilateral derecho sobre una plataforma climatizada (37º C), con 90º de flexión de rodilla y cadera, y con la pata inmovilizada. Se realizó una incisión del compartimiento anterior de la pata izquierda hasta la altura de la rodilla para acceder a los tendones del compartimiento anterior y al nervio peroneo común. Se separó el tendón distal del TA del extensor largo de los dedos y se fijó a un transductor de

fuerza (TRI201, *Letica Scientific Instruments*, Barcelona, Spain) por medio de un hilo de sutura de 4.0 no absorbible atado a un alambre de cobre. Se realizó este procedimiento para garantizar la posición de 90º del músculo en relación al eje del transductor de fuerza (83,84). Se utilizaron los mismos electrodos de hilo de cobre de las sesiones de NMES, y fueron posicionados directamente sobre el nervio peroneo común. Además, se utilizó el mismo electroestimulador y software. Durante todo el procedimiento, el músculo fue constantemente humedecido con una solución de *Ringer's buffer (84)*.

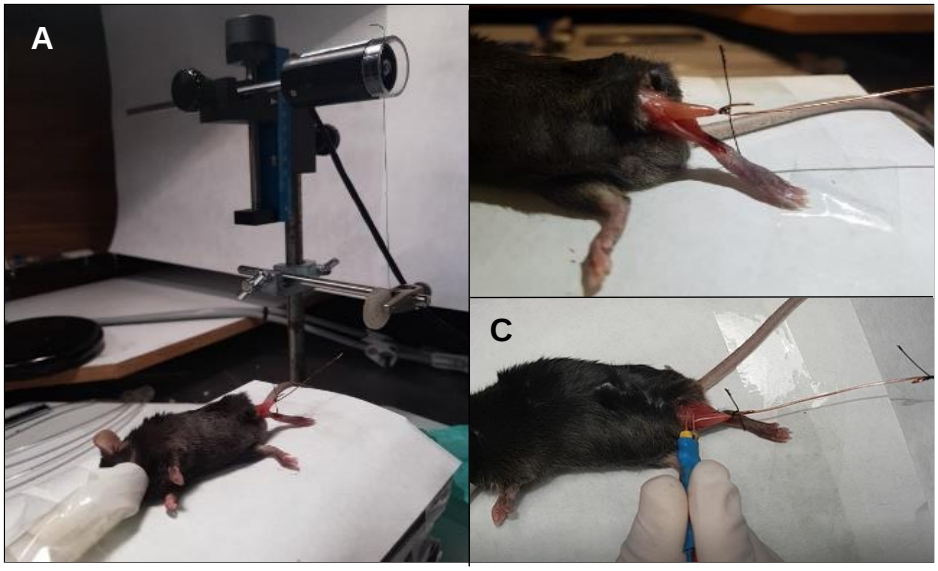

Figura 10: Ilustración del posicionamiento para la realización de las pruebas funcionales. Posicionamiento del ratón (A); posicionamiento del músculo TA (B); y posicionamiento de los electrodos (C).

Los protocolos utilizados para las pruebas funcionales fueron los siguientes:

- Longitud optima: Se determinó la longitud óptima, definida como la tensión con la que se obtenía la máxima fuerza ante un mismo estímulo. Para ello se realizaron registros de contracción tetánica a diferentes tensiones de reposo (~30 mN, 40 mN, 50 mN, 60mN y 70 mN), con frecuencia de 1 Hz, 20 V, 0.3 ms de anchura de pulso, con descanso de 30 s entre cada estímulo (84).

- Fuerza Máxima: se ajustó la longitud óptima y se realizaron 3 estímulos de contracción tetánica con un descanso de 3 min entre cada estímulo. La frecuencia fue de 100 Hz, 20 V, anchura de pulso de 0.3 ms y 30 reps (84).
- Fatiga: se ajustó la longitud óptima y con una frecuencia de 100 Hz, 20 V, anchura de pulso de 0.3 ms y 1200 reps, se estimuló hasta que la fuerza tetánica llegase al 50% de su valor original, registrando el tiempo requerido (85).

Una vez realizadas las pruebas funcionales, los animales fueron sacrificados para el estudio histológico y molecular del músculo TA.

Variables estructurales

A través de análisis histológico y molecular se observaron la capacidad angiogénica, miogénica, número de células satélites, isoformas y contenido total de MHC.

Pruebas histológicas y moleculares: De los 9 ratones del grupo experimental a los que no se les realizaron las pruebas funcionales, 5 fueron elegidos al azar para la disección del músculo TA y realización de pruebas histoquímica e inmunohistoquímica, los otros 4 TA fueron utilizados para el análisis protéico mediante *Western Blot.* La Figura 11 muestra en forma de diagrama el número de animales dedicados a cada tipo de estudio. Se eligió este método al haber comprobado en estudios de nuestro propio laboratorio (86), que la congelación del musculo justo después de recibir electroestimulación presentaba cristales en las fibras musculares, posiblemente debido a un proceso de inflamación. De forma similar se hizo en el grupo control; sin embargo, se disecaron los músculos TA derecho de los 5 ratones que participaron de las pruebas funcionales y luego se diseccionó el TA izquierdo de los demás ratones control (n=4) que no participaron de las pruebas, para *Western Blot.*

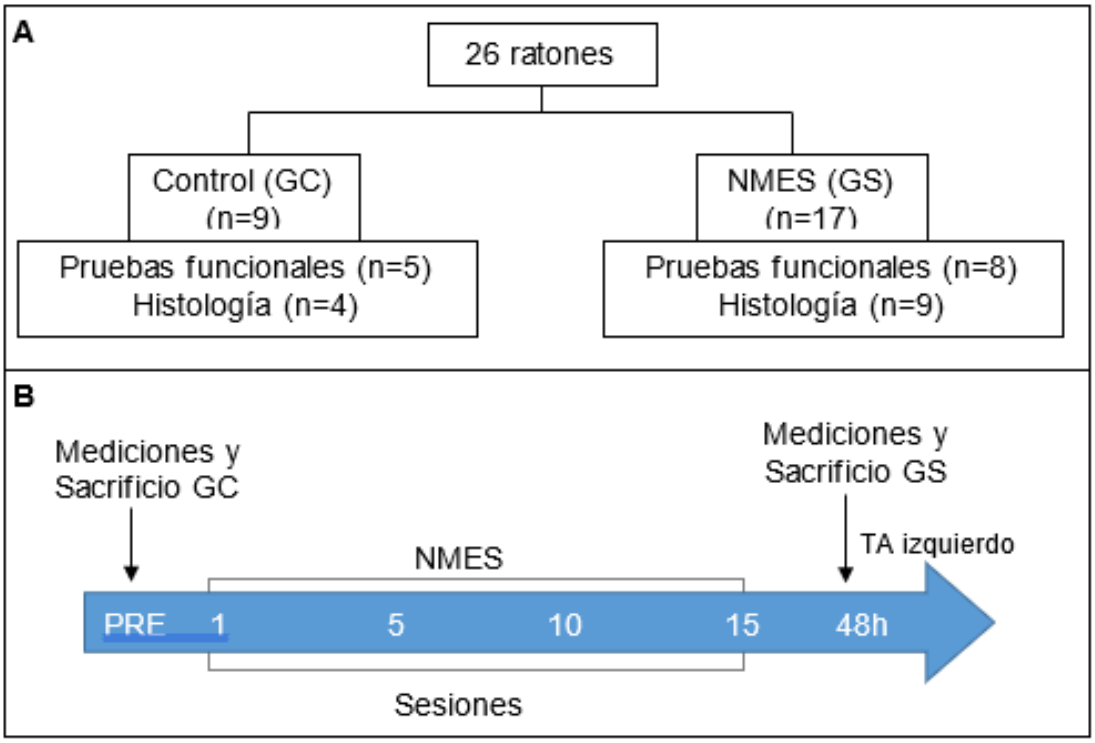

Figura 11: Diagrama de distribución de muestras. (A) Distribución de los animales para los distintos estudios realizados. (B) Mediciones realizadas, sacrificio de los animales y sesiones de NMES. Los números indicados (1 a 15) representan los números de sesiones. GC: Grupo control; GS: Grupo estimulado.

Marcaje Histoquímico e Inmunohistoquímico

Disección y congelación del músculo

Como ya se ha mencionado anteriormente, todos los ratones (grupo experimental y grupo control) fueron sacrificados a través de dislocación cervical bajo anestesia. De forma inmediata al sacrificio, se disecó el musculo TA y el mismo fue dispuesto sobre un papel absorbente para eliminar la humedad excesiva y luego fue pesado en una balanza de precisión. En un recipiente de metal se añadió isopentano y se sumergió parcialmente en nitrógeno líquido. Una vez el isopentano alcanzó una temperatura entre -140º y -149º C, con la ayuda de unas pinzas se sumergió el músculo TA durante 15 s. A continuación, las muestras fueron conservadas en tubos de *eppendorf* previamente enfriados a -80º C (87).

Preparación de los cortes histológicos

Se realizaron cortes seriados de 8 µm de espesor del vientre muscular del músculo TA mediante un criostato (Leica CM 1950, Alemania) mantenido a -22º C para análisis de los capilares (88) y de 10 µm para los demás análisis (27). Después de realizar los tratamientos histológicos correspondientes, se tomaron fotos individuales a través de un microscopio de Epifluorescencia BX *Olympus* con una cámara digital DP-71, con un *zoom* óptico al 40x. Para la determinación del área de la sección transversal de las fibras (FCSA, por sus siglas en inglés de *Fiber cross-sectional area*) y el recuento de los tipos de fibras musculares, se analizó un área de 0.59mm^2 de la región anterior del músculo TA. Para la medición del área se utilizó el programa *ImageJ Software* (1.46r ImageJ, National Institutes of Health, USA). Se eligió esta región del músculo por ser la región con mayor prevalencia de fibras tipo II, que son las que presentan una mayor respuesta a la NMES (51). El recuento de los mionucleos, células satélites y capilares fue realizado manualmente (89).

Se indica a continuación el procedimiento seguido para el marcaje y análisis aplicado en cada caso:

Tinción de los capilares

Se siguió el protocolo establecido por Fouces y colaboradores, y Rosenblatt y colaboradores (90,91). Las muestras fueron fijadas durante 5 min en formalina sacarosa (pH 7.6) en temperatura ambiente. Después de diversos lavados en agua destilada, se incubaron las muestras durante 1 h en temperatura ambiente y en agitación en una solución de gelatina, 0,1 M de Trismaleato (SIGMA), 0,06 M de nitrato de plomo, 0,068 M de $CaCl_2$ y ATP sódico, diluidos en agua destilada y con pH de 7.2. Luego, se realizaron otros lavados y se aplicó Sulfuro de Amonio al 2% durante 1 min. Se finalizó con lavados en agua y con el montaje sobre los portaobjetos bañados en glicerina. Se procedió a realizar el recuento de los puntos negros marcados que se encontraban en el perimisio.

Tinción del tejido conectivo

Se utilizó la técnica de Rojo Sirio, de acuerdo con protocolos extraidos de la bibliografía (89). Las secciones fueron fijadas con 4% Paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés de *Phosphate Buffered Saline*) durante 10 min, lavadas con PBS y de forma inmediata incubadas durante 30 min con una solución de Rojo Sirio saturada con ácido pícrico. A continuación, las muestras fueron rápidamente deshidratadas con etanol absoluto (PanReac), y montadas sobre portaobjetos con glicerina. Se utilizó el programa Image-Pro Plus 5.1 para cuantificar el porcentaje de tejido conectivo a través del área del rojo marcado.

Inmunohistoquímica

Una vez realizados los cortes transversales del musculo tibial anterior, fueron fijados en 4% de PFA en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas en PBS con 5% Suero *Donkey antimouse* + 0,2% de Triton x-100 durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los cortes histológicos fueron tratados secuencialmente con anticuerpos específicos para las diferentes isoformas de la cadena pesada de la miosina (MHC) (véase **Tabla 2**). Se utilizaron los anticuerpos primarios descritos por Bloemberg y Quadrilatero, y Zhou y colaboradores (27,92) para tipificar las fibras musculares según la MHC.

Tabla 2.
Anticuerpos utilizados para el marcaje inmunocitoquímico

Anticuerpos primarios*	Isoforma de MHC	Cw[a]
BA-F8	MHC I	1:15
SC-71	MHC IIA	1:30
BF-F3	MHC IIB	1:30
6H1	MHC IIX	1:15

*Casa comercial DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank, USA)

[a] Concentración de trabajo (su sigla en inglés)

Para el marcaje de las células satélites se utilizó un anticuerpo para el PAX7 de DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank, USA) con a una dilución de 1:100. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: *Cy2 Donkey anti-mouse (Thermo Fisher* A21200) a una dilución de 1/700 y Cy3 *Donkey anti-mouse* (*Jackson Immuno Research* 715-165-150) a una dilución 1:200. Una vez realizada la incubación del anticuerpo secundario, se procedió al marcaje de mionucleos con DAPI (4‘,6-diamidino-2-fenilindo) en las mismas muestras marcadas para identificar células satélites, durante 10 min.

Se han utilizado diluciones distintas de la descrita por Bloemberg y Quadrilatero (27) debido a que los anticuerpos secundarios utilizados en nuestro trabajo eran de distinta casa comercial. Así mismo, las tinciones de cada anticuerpo primario fueron realizadas de forma independiente.

A continuación, utilizando el programa *Adobe Photoshop Cs6* se solaparon las imágenes para realizar la tipificación de fibras y el recuento de células satélites y mionúcleos. Se hicieron varias pruebas piloto para verificar la concentración óptima de trabajo y el tiempo de incubación de los anticuerpos primarios. Tras ellas, comprobamos que el tiempo de incubación óptimo de los anticuerpos primarios debía ser al menos 12 h (*overnight*) y de 1 h para los anticuerpos secundarios. Ambos fueron incubados dentro de una cámara húmeda y oscura, a temperatura

ambiente.La Figura 12 muestra de forma esquemática todo el proceso de marcaje inmunocitoquímico.

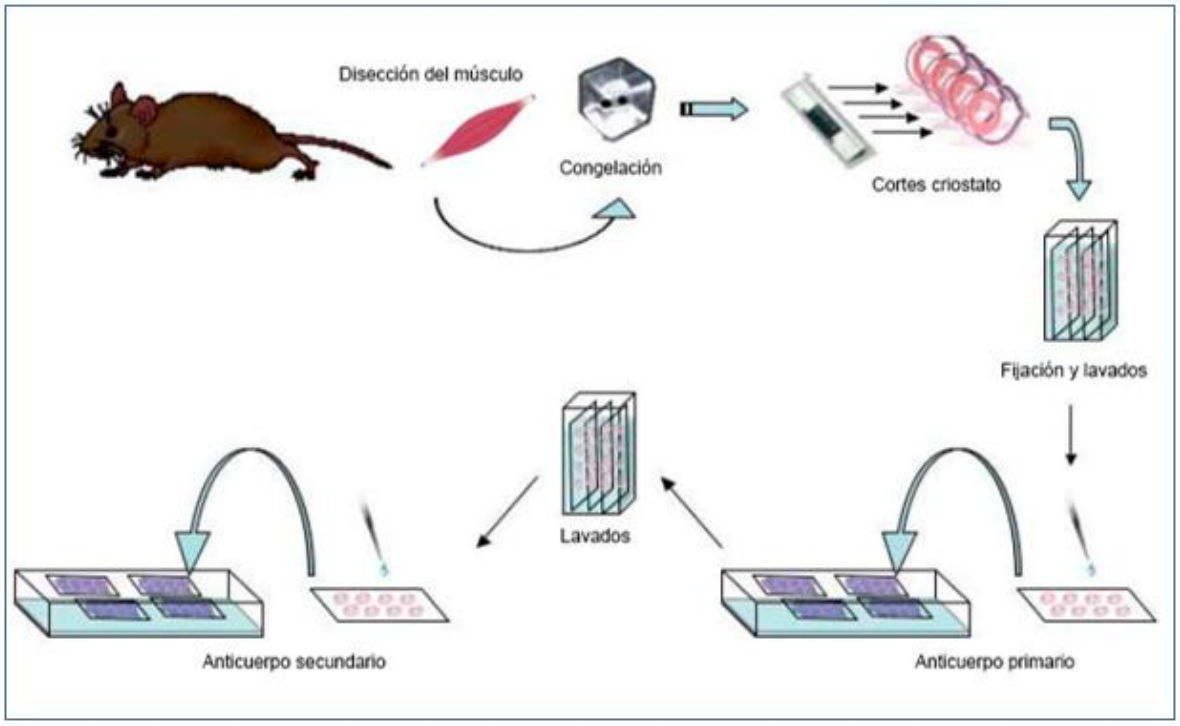

Figura 12: Esquema del proceso de marcaje inmunohistoquímico. Adaptado de Forns (93)

Pruebas Moleculares: Western Blot

Para el análisis de la variación del contenido total de MHC y de la isoforma IIB se utilizaron 4 músculos del TA de animales del grupo experimental y 4 de animales del grupo control que no habían participado en las pruebas funcionales. Una vez diseccionados, los músculos fueron almacenados en una solución de RNA *later* a -22ºC.

El protocolo utilizado para la extracción y cuantificación de proteína fue el descrito por Gondin y colaboradores (94). El musculo fue mantenido durante 1 h en un tampón de lisis *Passive Lysis Buffer* 5X (Promega Part; Cw 1:4 diluido en H_20) y fue

centrifugado a 1500 rpm a 4º C durante 20 min para extraer las proteínas. Se utilizó el método de *Lowry* para cuantificar el contenido de proteínas y el método de *Bradford* para calcular la concentración (95). Se tomaron 5 µl de muestra y se añadieron a 250 µl de mezcla (2 ml H_20 + 500 µl de solución *Bradford*). Una vez cuantificada la proteína se estableció qué cantidad se necesitaba de muestra para 30 µg de preparación. De esta forma, 30 µg de preparado de la muestra fueron cargados en geles de poliacrilamida al 6% SDS-PAGE para la electroforesis. Las proteínas fueron transferidas de los geles a las membranas de transferencia de PVDF con poros de 0,2 µm (ThermoFisher Scientific™) y fueron bloqueadas con 5% de leche bovina y una solución salina de *Tris Buffered* (TBS; 0,02 M Tris y 0,05 M NaCl, pH 7,4-7,6) durante 1 h. A continuación, se realizó la incubación de los anticuerpos primarios a 4º C *overnight*. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para identificar la isoforma MHC IIB (BF-F3; DSHB, USA) a una dilución de 1:500 y para el contenido total de MHC (Ab 124205, Abcam) a una dilución de 1:1000.

Después de diversos lavados en 0,1% de *Tween* + TBS, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario *Anti-mouse IgG* (SIGMA) a una dilución de 1:5000 por 1 h en temperatura ambiente. Se procedió al revelado utilizando un potenciador de luminosidad y una solución de peróxido (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher Scientific™). Para el análisis del *Western blot* se utilizó el programa ImageJ Software (1.46r ImageJ, National Institutes of Health, USA), y se evaluó el contenido de proteínas a través del área de la intensidad del brillo de las bandas. La Figura 13 muestra de forma esquemática todo el proceso de análisis por *Western blot*.

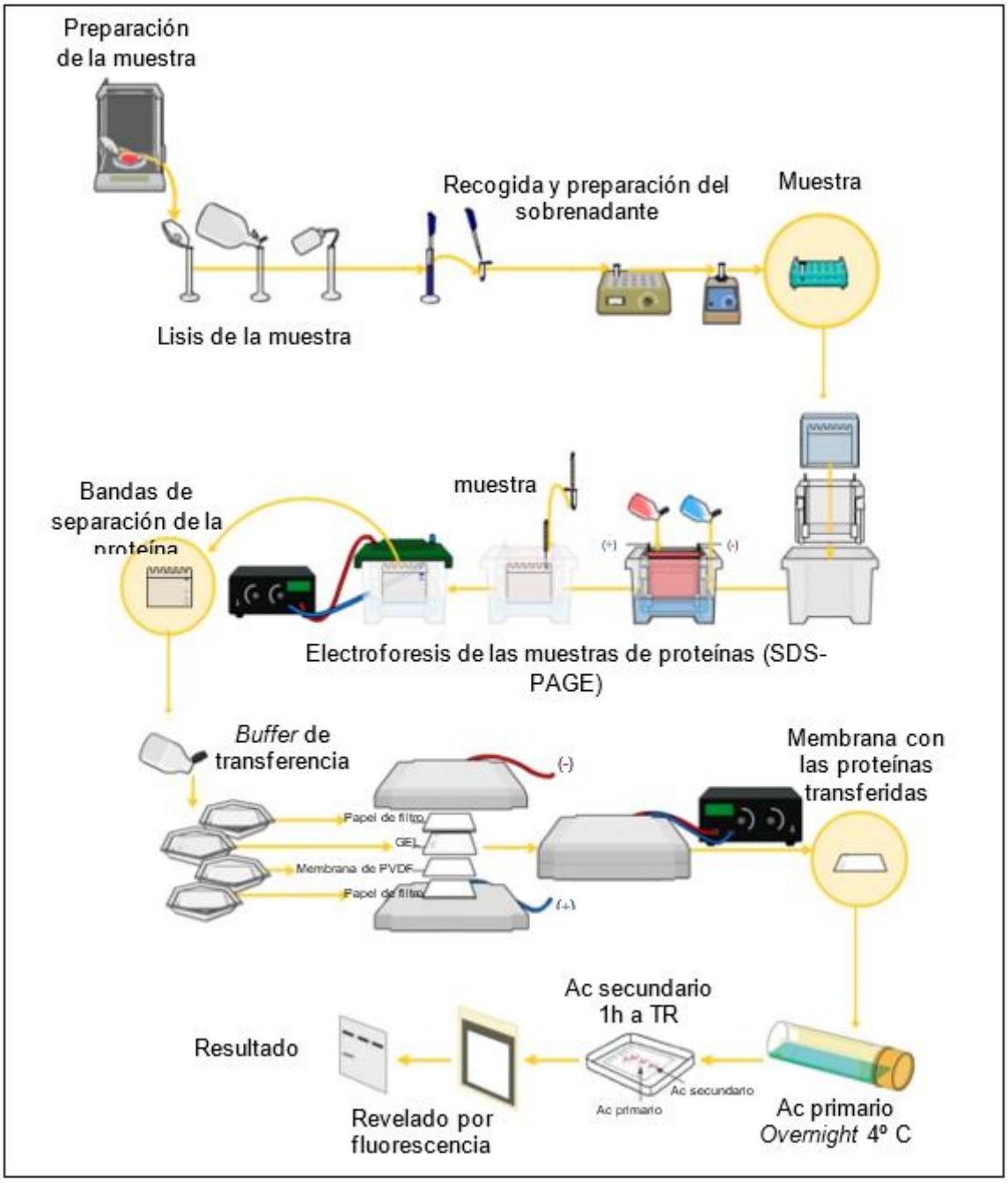

Figura 13: Esquema del proceso de *Western blot*. Tras sacrificar el animal se disecó el músculo TA y se almacenó en una solución de *RNA later* a -22º C. Ilustración obtenida y adaptada del internet (96)

ESTUDIO DE ELECTROESTIMULACIÓN TRANSCRANEAL

Para este estudio, se reclutaron mujeres voluntarias sanas de edad entre 45 – 65 años, sin tratamiento previo con tDCS, con un índice de masa corporal (IMC) en la categoría de sobrepeso/obesidad clase I (25-35 kg/m^2) procedentes del Centro Médico Complutense, y de la propia Universidad de Alcalá de Henares, de la Comunidad de Madrid. Los criterios de exclusión incluyeron diabetes, cirugía bariátrica, cualquier condición conocida que estuviera asociada con aumento de peso u obesidad, tabaquismo/adicción, enfermedad neurológica o psiquiátrica y contraindicaciones para recibir tDCS (epilepsia, marcapasos, implantes metálicos o cirugía en el área de la cabeza, y cualquier enfermedad de la piel o lesión que impacta el área adyacente a la colocación del electrodo tDCS). Las participantes fueron evaluadas previamente para su elegibilidad por entrevista telefónica y/o por correo electrónico. Una vez que la participante era elegible, se la invitó a una visita de referencia donde realizó la entrevista formal por personal profesional, con el objetivo de confirmar la elegibilidad y descartar los criterios de exclusión relacionados con afecciones médicas.

Diseño de Estudio y Protocolo

Después de una visita inicial que consistió en la tramitación de los procedimientos de consentimiento informado y una evaluación/entrevista, las participantes fueron asignadas al azar a uno de dos grupos: tDCS activo o tDCS simulado (control) como parte de un período de 4 semanas de intervención. La aleatorización se estratificó según la edad (2 estratos) y el IMC (2 estratos) para garantizar una distribución equilibrada de los sujetos. Durante la semana 1 de la intervención, los sujetos recibieron sesiones diarias de tDCS en días laborales (total: 5 sesiones). Al comienzo de la semana 2, a las participantes se les prescribió una dieta hipocalórica (20 kcal/kg/día), mientras continuaban con tDCS en días laborales alternos (total: 3 sesiones). Durante las semanas 2 a 4, se pidió a las participantes que siguieran la dieta en su vida diaria, sin supervisión. Las participantes fueron evaluadas con

respecto a los cambios en el peso corporal (resultado primario), apetito subjetivo y ansia por la comida (resultados secundarios). Además, las participantes se sometieron a dos sesiones de pruebas neuropsicológicas computarizadas al inicio del protocolo y al final de la segunda semana, con el objetivo de evaluar los cambios en el desempeño ejecutivo en presencia de señales de alimentos. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional local de la Universidad de Alcalá (CEI / HU / 2016/11) y se registró públicamente en ClinicalTrials.gov (identificador: NCT03351426). Todos los procedimientos se adhirieron a los principios éticos de la declaración de Helsinki. El protocolo del estudio se muestra en la Figura 14.

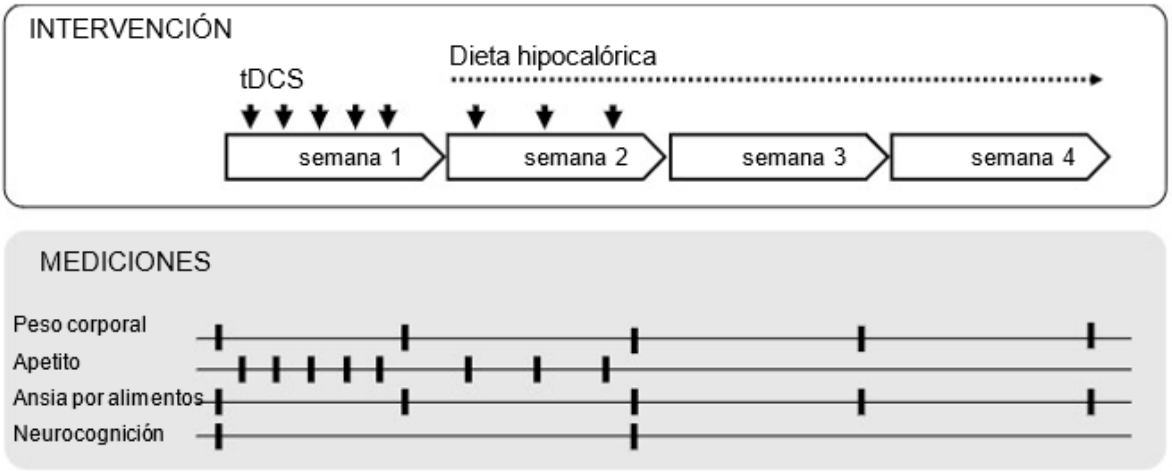

Figura 14: Diseño experimental del estudio de tDCS. Cronograma de intervención y determinación de variables

Dieta Hipocalórica

A partir de la semana 2, se pidió a las participantes que siguieran una dieta hipocalórica prescrita bajo la supervisión de un endocrinólogo. El objetivo de calorías para la dieta fue de 20 kcal/kg/día, con un objetivo de 45-55% de carbohidratos, enfatizando un índice glucémico bajo, una ingesta moderada de grasas saludables (ácido oleico y aceite de pescado) y un contenido de proteína del 15-25%. Se alentó a las participantes a seguir un patrón dietético de estilo mediterráneo que favoreciera los alimentos de origen vegetal como verduras, frutas, judías, nueces, legumbres y cereales, junto con el pescado y el aceite de oliva virgen

extra como la principal fuente de grasa. Para lograr estos objetivos, las participantes recibieron una sesión educativa inicial y material escrito que incluía ejemplos de menú de temporada y guías visuales para estimar el tamaño de las porciones. Todos los procedimientos y materiales dietéticos se basaron en un programa dietético (https://www.programadietasfaes.com) (97). Durante la dieta, los sujetos recibieron instrucciones de mantener constantes sus niveles de actividad física.

tDCS

El tDCS se realizó mediante un dispositivo BRAINSTIM (www.BrainSTIM.it) (EMS Medical, Bolonia, Italia) utilizando un montaje destinado a mejorar la excitabilidad de la corteza dorsolateral prefrontal (DLPFC, por sus siglas en inglés de *Dorsolateral Prefrontal Cortex*) izquierdo (ánodo sobre F3, basado en el sistema 10:20, y cátodo sobre el área supraorbital derecho) (Figura 15). Se utilizaron los siguientes parámetros de electroestimulación: intensidad de corriente 2 mA, 20 minutos de duración (30 s de entrada/salida) y electrodos de esponja de 5x5 cm empapados en solución salina al 0,9%. Para la estimulación simulada, la corriente eléctrica fluyó durante solo 15 s, con una aparición/desaparición gradual similar al comienzo y al final de 20 minutos, para imitar las sensaciones subjetivas que ocurren con tDCS activo (98). Se utilizaron dos dispositivos, uno programado para enviar tDCS activo y el otro programado con parámetros de estimulación simulada. Como control de calidad, un ingeniero realizó pruebas eléctricas de la salida del dispositivo con regularidad para garantizar que la administración de la estimulación fuera precisa. Antes de la colocación de los electrodos, se realizó la limpieza de la piel para eliminar cualquier signo de loción, polvo, u otras partículas que pudieran dificultar la conducción.

Durante las sesiones de tDCS, los sujetos estaban cómodamente sentados, al tiempo que se les pidió que atendieran un video con imágenes y sonidos relajantes, que representan escenas naturales.

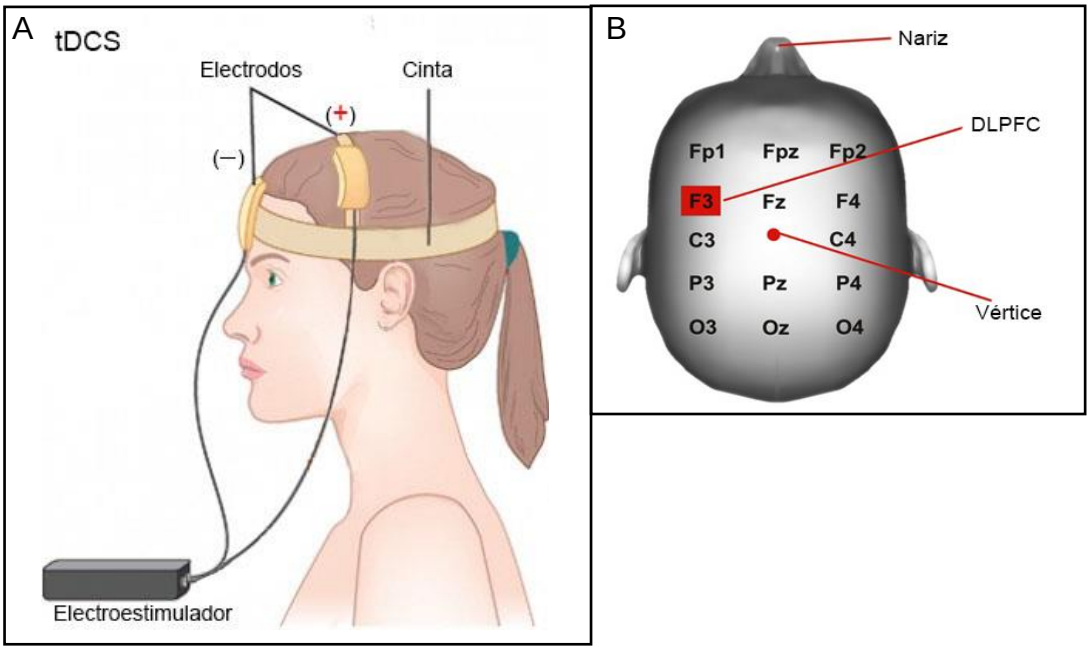

Figura 15: Ilustración del posicionamiento de los electrodos. Electrodo ánodo sobre punto F3 y cátodo sobre el área supraorbital derecho. (A) Ilustración obtenida y adaptada del internet (99) (B) Ilustración obtenida de DaSilva (100)

Cegamiento del Estudio

Tanto los participantes como los investigadores que administraron la estimulación y obtuvieron información sobre los resultados permanecieron cegados a la asignación grupal. Los dispositivos tDCS se utilizaron en un modo que no permitía mostrar información sobre los parámetros de estimulación para el personal o los participantes. Además, para evaluar el éxito del cegamiento, se pidió a los sujetos que adivinaran su asignación grupal al final del estudio.

Variables del Estudio

Peso corporal

El peso corporal se obtuvo al inicio del protocolo y semanalmente durante el estudio, utilizando una balanza digital Tanita BC-601 ajustada al primer decimal (Tanita Corp., Tokio, Japón). Las participantes vestían ropa ligera y estaban

descalzas. Para cada participante, la hora del día en que se obtuvo el peso permaneció fija.

Apetito

El apetito se evaluó mediante escalas analógicas visuales (EVA). Resultados autoinformados a las preguntas "¿Cuánto hambre tienes?", "¿Cómo estás de lleno?", "¿Cuánto deseas comer?" y "¿Cuánta comida crees que podrías comer ahora?", que representan el estado actual de la participante, fueron evaluados con escalas horizontales, de 100 mm de longitud, ancladas por descriptores de palabras, con base en métodos previamente validados (101). Los sujetos completaron las EVA al inicio y en todas las sesiones de tDCS bajo una ventana de ayuno de 2-4 horas.

Cuestionarios

Todos los participantes completaron los cuestionarios bajo las mismas condiciones de información y voluntariedad.

Ansia por la comida: el ansia por alimentos se evaluó utilizando las versiones en español de Cuestionario de Ansia por la Comida – Rasgo (FCQ-T, por sus siglas en inglés de *Food Craving Questionnaire-Trait*), al inicio del estudio, y el Cuestionario de Ansia por la Comida – Estado (FCQ-S, por sus siglas en inglés de *Food Craving Questionnaire-State*), al inicio del estudio y semanalmente. Las puntuaciones totales y parciales se estimaron para cada cuestionario/punto temporal. Las puntuaciones totales, tanto de la escala completa como de cada uno de los factores por separado, se calculó sumando las puntuaciones de cada posibilidad de respuesta (102).

- FCQ-T: (**véase anexo II**) El objetivo de este cuestionario es evaluar las características estables en el tiempo del deseo intenso de comer un tipo de comida en particular a través de distintas situaciones, es decir, los deseos de

comer característicos de la persona. Las instrucciones indican a los participantes con qué frecuencia cada afirmación "sería cierta para usted en general" utilizando una escala de 6 puntos que varían de 1 (nunca o no aplicable) a 6 (siempre). Las nueve escalas del FCQ-T miden los antojos experimentados o asociados con: (a) refuerzo positivo, (b) refuerzo negativo, (c) alimentación dependiente de la señal, (d) sentimientos de hambre, (e) preocupación por la comida, (f) Intenciones de comer, (g) Falta de control, (h) Afecto negativo, y (i) Sentimientos de culpabilidad.

- FCQ-S: (**véase anexo II**) El objetivo de este estudio es medir la intensidad de los deseos de comer en el presente inmediato. Las instrucciones indican a los participantes que expresen en qué medida están de acuerdo con cada afirmación en ese mismo momento utilizando una escala tipo Likert de 5 puntos que varió de 1 (absolutamente nada de acuerdo) a 5 (muy de acuerdo). Los 5 factores o escalas incluyen: Factor 1: "Un deseo intenso de comer", Factor 2: "Anticipación del refuerzo positivo que puede resultar de comer", Factor 3: "Anticipación del alivio de estados y sentimientos negativos como resultado de comer", Factor 4: "Falta de control sobre la alimentación", Factor 5: "Ansia de hambre".

La evidencia de la validez de ambos cuestionarios incluye la validez predictiva, convergente y divergente en muestras españolas e inglesas (103-105)

Comportamiento alimentario*:* los rasgos del comportamiento alimentario se evaluaron al inicio del estudio con la versión en español del Cuestionario de Alimentación de Tres Factores versión R18 (TFEQ-R18, por sus siglas en inglés de *Three Factor Eating Questionnaire-Versión R18*). Este cuestionario analiza a través de 18 ítems, el comportamiento alimentario desde tres vertientes psicológicas (cognitiva, conductual y emocional) y predice el papel que ejercen sobre la alimentación. Asimismo, evalúa tres dimensiones de la conducta alimentaria: a) restricción alimentaria, donde se mide el dominio cognitivo y la ingestión de

alimentos; b) la desinhibición, que valora la propensión de comer en exceso y la pérdida de control; y, c) la susceptibilidad al hambre que analizan las emociones subjetivas del hambre y el deseo por la comida (106,107). Las variables de este cuestionario son evaluadas por separado, y describieron el perfil emocional de los participantes relacionado con la alimentación (**véase anexo II**).

Pruebas Neuropsicológicas

Las participantes se sometieron a pruebas de neuropsicología al inicio del estudio y al final de la semana 2. Durante cada una de estas sesiones las participantes realizaron una tarea informática que constaba de tres bloques. El primer bloque fue una tarea *Go*/*No-Go* modificada por alimentos, donde las participantes veían en la pantalla imágenes de alimentos de alto y bajo contenido en calorías, y se les pedía que presionasen la barra espaciadora de un teclado solo cuando el elemento era bajo en calorías. La prueba estaba constituida por 200 ensayos, de 1,5 segundos cada uno, 20% *No-Go*; ~ 5 minutos en total. Estudios previos llevados a cabo por otros autores también han utilizado pruebas similares (108). Para minimizar los efectos de aprendizaje debido a la administración repetida de la tarea, se procedió a una selección aleatoria y un orden de imágenes de alimentos para cada sesión. Se tomaron imágenes de alimentos de una batería validada y publicada (109). El segundo bloque era una tarea de trabajo de memoria con imágenes de alimentos, donde los sujetos tenían que presionar la barra espaciadora cada vez que la imagen de alimentos presentada en la pantalla coincidía con la que se había presentado dos imágenes antes (200 pruebas, 1,5 segundos cada una, 45% ensayos comparados; ~ 5 min). Esta prueba ha sido utilizada por otros autores en un estudio reciente de tDCS (110). Finalmente, el tercer bloque consistió en una tarea dual *Go/No-Go* donde las participantes realizaron una combinación de las tareas anteriores, es decir, una tarea con imágenes de alimentos donde tenían que responder solo si el alimento era bajo en caloría (400 ensayos, 1,5 segundos cada uno, 22,5% ensayos No-Go coincidentes; ~ 10 min). Esta doble tarea exigía una combinación de control inhibitorio, memoria de trabajo y cambio de atención. La

justificación para la selección de estas tareas proviene de la comprensión actual de las bases neurocognitivas de la obesidad y la contribución de la corteza prefrontal dorso lateral (111-114) (Figura 16).

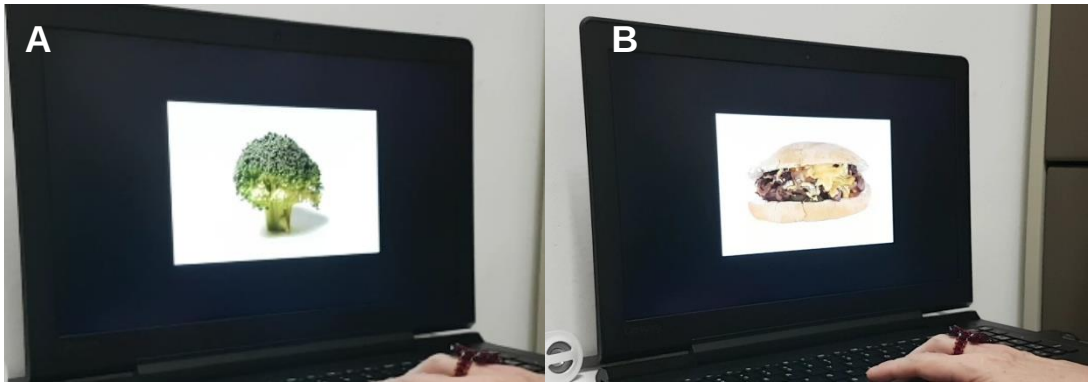

Figura 16: Ilustración de la prueba neuropsicológica. Ejemplo de alimentos de bajo (**A**) y alto (**B**) contenido calórico.

Efectos adversos

La incidencia de los efectos adversos se evaluó mediante preguntas abiertas en cada visita y utilizando sistemáticamente un cuestionario estándar comúnmente utilizado en los estudios de tDCS (78). Este cuestionario se utilizó para recopilar los efectos adversos antes e inmediatamente después de cada sesión de tDCS.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para comparar los dos grupos (Control *vs.* Experimental) del estudio llevado a cabo en animales de experimentación se realizó la prueba *U de Mann-Whitney* para muestras independientes para las variables peso corporal, masa muscular, área de la sección transversal de las fibras musculares según su isoforma, tipos de fibras, capacidad angiogénica y mionucleares. Para el análisis de las variables contráctiles, contenido de proteínas de la MHC y tejido conectivo, se utilizó la prueba *t-student* para muestras independientes.

Los cambios en el peso corporal se evaluaron como % de cambio desde el inicio para cada punto temporal, como se especificó previamente en el registro del protocolo.

En el estudio de electroestimulación transcraneal, las variables adicionales (apetito, ansia por la comida, y el rendimiento neurocognitivo) se calcularon como cambio desde el inicio hasta la finalización. Antes del análisis, todos los datos se evaluaron primero para la distribución de la normalidad utilizando la prueba de *Kolmogorov-Smirnov.* Se analizaron datos de medidas repetidas que incluyeron > 2 puntos de tiempo utilizando modelos lineales mixtos; Se usó ANOVA mixto para los otros casos. Examinamos los efectos del grupo, el tiempo y el grupo de interacción x tiempo para cada resultado. Las comparaciones post hoc y exploratorias se realizaron como se indica en el texto de los resultados.

Los análisis se implementaron en *IBM SPSS Statistics v.22* (IBM Corp. Armonk, NY), excepto los modelos lineales mixtos, que se realizaron en SAS v.9.4 (SAS Inc., Cary, NC). El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$, hipótesis de dos colas, y los resultados se expresan como media ± desviación estándar; en los casos que se utiliza el error estándar de la media, se indica específicamente en el texto de los resultados.

RESULTADOS

CAPITULO 1: ELECTROESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR:

¿Un protocolo de 15 sesiones de electroestimulación neuromuscular de alta frecuencia es suficiente para inducir cambios en las propiedades contráctiles y moleculares, y en la capacidad angiogénica y miogénica del músculo estriado?

Contenido en Fibras Musculares del Músculo Tibial Anterior

La Figura 17 muestra un corte histológico representativo en el que se aprecia el fenotipo lento/rápido (Figura 17A) y aeróbico/anaeróbico (Figura 17B) de las fibras tal y como puede observarse en las preparaciones histológicas de músculo tibial anterior del ratón. En el área analizada a mayor aumento, se observa un predominio de fibras rápidas (Figura 17C). De igual forma, también se puede detectar una mayoría de fibras anaeróbicas (53,5 ± 8,1%) en comparación con aeróbicos (21,2 ± 6,4%) e intermedios (25,3 ± 8,0%) (Figura 17D).

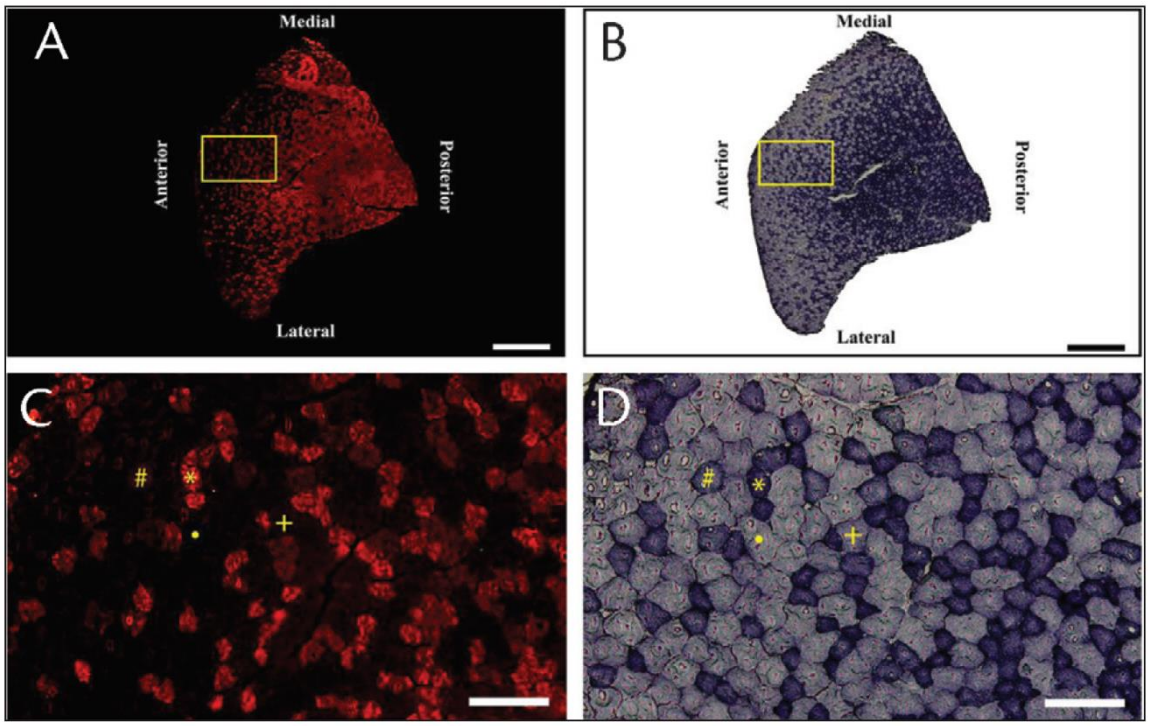

Figura. 17. Secciones transversales representativas del músculo tibial anterior de ratón. Fotografía de una sección muscular y microfotografía de la zona analizada (resaltada mediante un rectángulo amarillo). Las secciones transversales fueron estudiadas mediante marcaje inmunocitoquímico (**A**) e histoquímica enzimática (**B**). El marcaje inmunocitoquímico permite diferenciar las fibras lentas (marcadas en rojo) y rápidas (sin marcar) con relación a la expresión de la cadena pesada de miosina (**C**). El marcaje mediante histoquímica enzimática permite diferenciar las fibras en anaeróbicas (blanco), aeróbico (violeta oscuro) o intermedias (púrpura), en relación con su capacidad oxidativa (**D**). Los símbolos *, +, •, #, representan las mismas fibras musculares en las distintas imágenes. La barra de escala representa 1.000 µm en A y B y 200 µm en C y D.

Efectos del Entrenamiento Mediante Electroestimulación Sobre las Características Estructurales del Músculo

Quince sesiones de entrenamiento de neuroelectroestimulación (NMES) de alta frecuencia provocó una hipertrofia marcada del músculo tibial anterior en todos ratones analizados. La **Tabla 3** resume los cambios producidos por las 15 sesiones de neuroelectroestimulación muscular, comparando un músculo estimulado (ST) en comparación con el grupo control (CT). No se observaron diferencias entre grupos en el peso corporal, mientras que, la masa muscular del grupo electroestimulado

presentó un aumento de 7,3% comparado con el grupo control ($p < 0.01$). Al analizar un promedio de 57 ± 8 fibras por musculo, se observó que el área de sección de las fibras musculares aumentó significativamente después de las 15 sesiones para el grupo estimulado (de 1870 ± 306 a 2385 ± 369 μm^2; $p < 0.01$).

Tabla 3.

Características de ratones C57BL/6J y del músculo tibial anterior de ratones tras el estudio.

	CT	ST	*p* valor
Peso corporal (mg)	26,5 (4.2)	25.8 (3.2)	0.62 [a]
Masa muscular TA (mg)	41.9 (3.2)	45.21 (3.4)	**0.002** [a*]
Relación músculo / peso corporal (mg. g^{-1})	1.64 (0.17)	1.77 (0.21)	**0.0008** [a*]
FCSA total (μm^2)	1870 (306)	2385 (369)	**0.0005** [a*]
FCSA fibras lentas (μm^2)	1093 (206)	1294 (128)	0.309 [b]
FCSA fibras rápidas (μm^2)	1744 (231)	2352 (257)	**0.015** [b*]

Grupo Control (CT) comparado al Grupo Estimulado (ST). Media (Desviación estándar). [a] *t* test para muestras independientes; [b]*Mann-Whitney test;* * Diferencia significativa ($p < 0.05$)

La Figura 18 muestra el incremento significativo de la masa muscular ($p < 0.05$, $r = 0.55$, Figura 18A), así como del área de sección de las fibras musculares ($p < 0,001$, $r = 0,71$, Figura 18B) en las extremidades sometidas a electroestimulación.

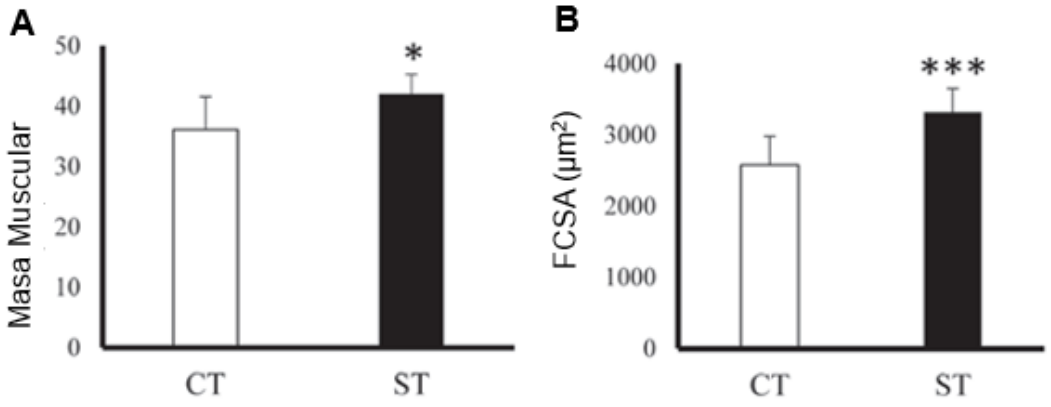

Figura 18. Efecto del entrenamiento mediante la electroestimulación neuromuscular. Los histogramas representan el efecto de la neuroelectroestimulación sobre la masa muscular **(A)** y sobre el área de sección muscular **(B)** en extremidades control (CT) y extremidades estimuladas (ST). Los datos representan valores de media y desviación estándar. Diferencias significativas: *p<0.05; ***p<0.001.

Al realizar el análisis según el fenotipo de fibra muscular, se observó un aumento significativo del área de sección de las fibras musculares (FCSA) a favor de las fibras rápidas, no observándose cambios significativos para las fibras lentas (Figura 19).

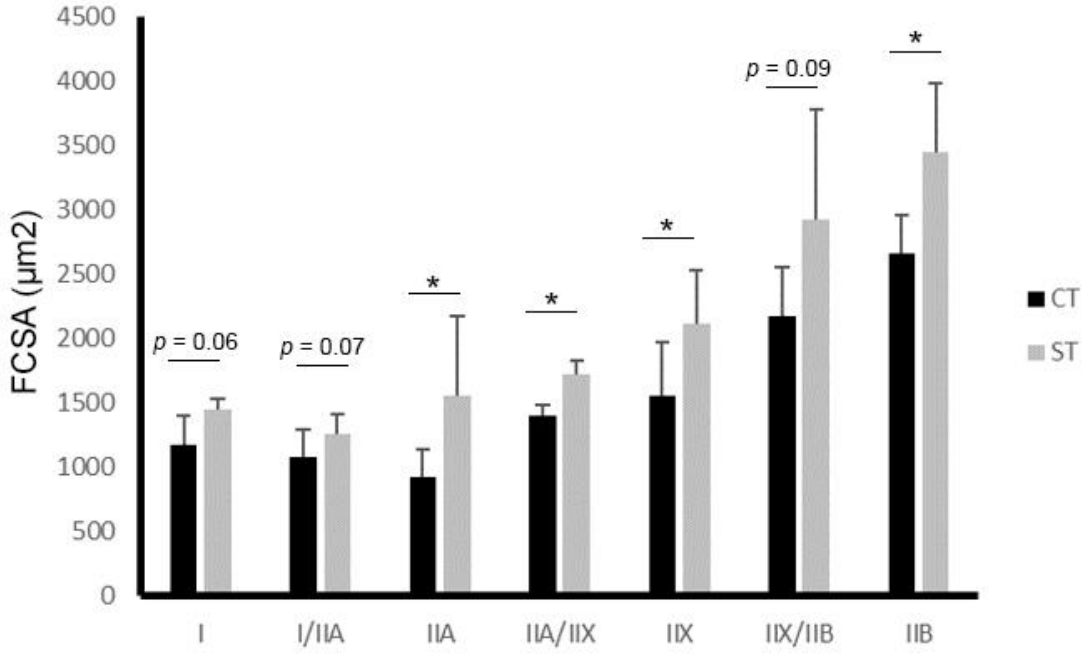

Figura 19: Área transversal de las fibras del músculo tibial anterior según su tipología. Aumento significativo del FCSA para las fibras IIA, IIA/IIX, IIX y IIB del grupo estimulado, comparado con el grupo control. Las barras del histograma indican media ± desviación estándar. *Diferencias significativa comparado al CT ($p<0.05$) a través del *Mann-Whitney test*.

Efectos del Entrenamiento Mediante Electroestimulación Sobre las Características Funcionales Del Músculo

Las adaptaciones producidas en la función contráctil como consecuencia de la electroestimulación se muestran en la **Tabla 4**. En general, se observó una mejora de las variables contráctiles relacionadas con la producción de fuerza, con un aumento del 15% en la fuerza de contracción ante un único estímulo (*twitch*), y del 17% para la contracción tetánica, ambas expresadas en valores absolutos. Mejoró

también la ratio de desarrollo de fuerza ante ambos estímulos y la resistencia a la fatiga. Sin embargo, no se observaron mejoras significativas en la fuerza relativa a la masa muscular, ni en las variables contráctiles relacionadas con la relajación.

Tabla 4.

Efectos de la electroestimulación en la función contráctil del musculo TA

	CT	**ST**	***p* valor**
Fuerza de un *Twitch* (mN)	85.1 (13.4)	97.8 (12.4)	**0.01** [a]*
Fuerza relativa de *Twitch* (mN/mg)	0.20 (0.02)	0.21 (0.03)	0.15 [a]
Twitch RFD (mN/ms)	4.84 (0.92)	5.54 (1.23)	**0.04** [a]*
Twitch ½ RT (ms)	24.3 (4.4)	24.5 (4.1)	0.88 [a]
Twitch ½ RR (mN/ms)	1.80 (0.47)	2.06 (0.48)	0.09 [a]
Fuerza Tetánica (mN)	247.2 (32.2)	289.1 (44.5)	**0.04** [a]*
Fuerza Tetánica relativa (mN/mg)	0.57 (0.06)	0.62 (0.11)	0.33 [a]
Tetánica RFD (mN)	4.17 (0.66)	4.96 (0.94)	**0.03** [a]*
Tiempo de Fatiga (s)	4.96 (1.66)	10.15 (3.74)	**0.02** [a]*

Grupo CT comparado al ST tras 15 sesiones de NMES de alta frecuencia. *Twitch* - fuerza de una única contracción a una frecuencia de 1 Hz; *Fuerza Tetánica* - Fuerza isométrica con 100 Hz de contracción tetánica; *Tiempo de Fatiga* con una frecuencia de 100Hz hasta llegar al 50% de la fuerza máxima alcanzada; RFD (tasa de desarrollo de fuerza); RT (Tiempo de relajación); RR (tasa de relajación. Los valores son media ± desviación estándar. * Diferencias significativa comparado al CT ($p<0.05$).

La Figura 20 muestra ejemplos de la contracción muscular registrada en un músculo control y un músculo entrenado, en respuesta ante una contracción muscular aislada (*Twitch*) (Figura 20A), así como ante una estimulación tetánica de alta frecuencia (Figura 20B). Asimismo, se muestra la disminución de la fuerza de contracción ante un estímulo mantenido durante 20 segundos (Figura 20C).

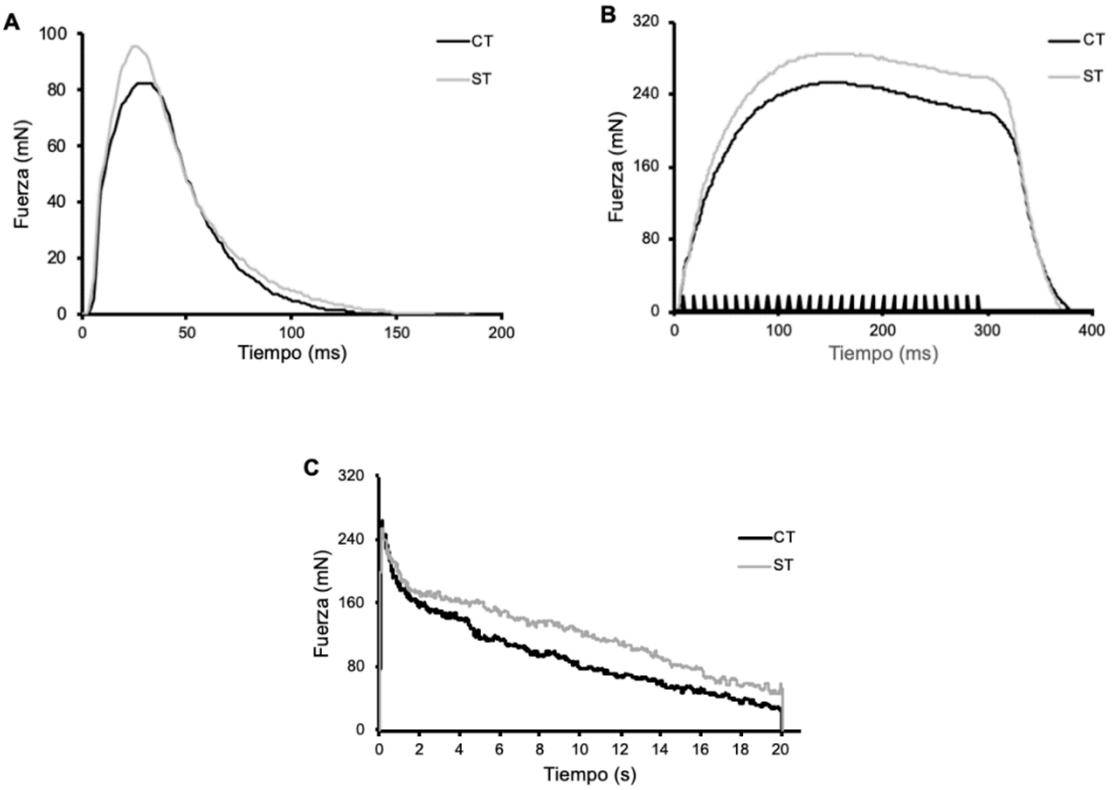

Figura 20: Efectos de la electroestimulación neuromuscular sobre las propiedades contráctiles del músculo. Trazados de la fuerza máxima registrada en un músculo tibial anterior de un animal control (CT) y un animal entrenado (ST), en respuesta a un estímulo aislado (A). **(**B) Fuerza isométrica registrada en respuesta a una contracción tetánica de alta frecuencia (100 Hz y 300 ms). (C) Trazado continuo de la contracción mantenida, y respuesta a la fatiga tras contracción tetánica de alta frecuencia (100 Hz durante 20 s).

El efecto del entrenamiento determinó un incremento significativo en la fuerza máxima ($p < 0.01$, $r = 0,64$, Figura 21B) y de la velocidad a la que se desarrolla la fuerza (Nw/ms, $p < 0,05$, $r = 0,64$, Figura 21A).

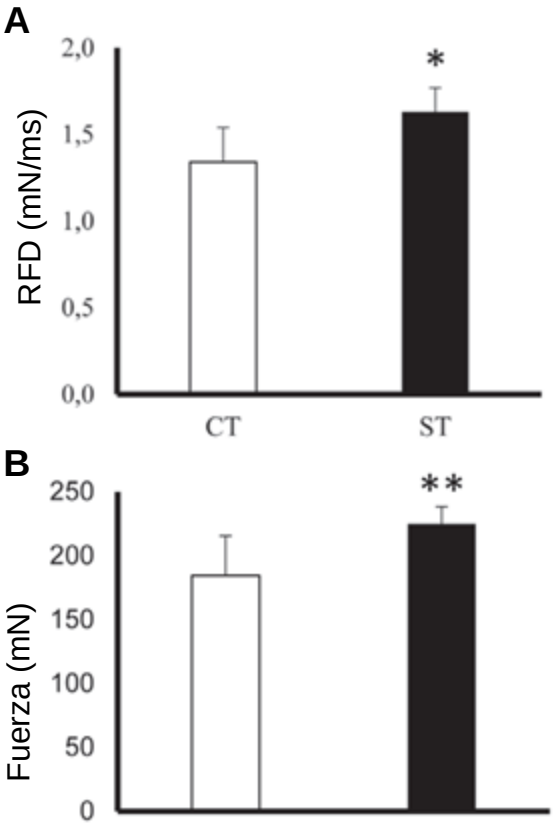

Figura 21. Efectos del entrenamiento de electroestimulación neuromuscular sobre las propiedades contráctiles del músculo. (A) Representación gráfica de la velocidad de desarrollo de la fuerza (Nw/ms) analizada en músculos controles (CT) y músculos entrenados (ST). (B) Representación gráfica de la fuerza máxima desarrollada por las extremidades control (columna blanca) y las sometidas a entrenamiento de estimulación (columna negra). Los datos corresponden a las medias y desviación estándar. Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Efectos del Entrenamiento Mediante Electroestimulación Sobre los Subtipos de Fibras Musculares

En otra serie de experimentos se estudió la distribución de la cadena pesada de miosina (MHC), y su cuantificación por inmunohistoquímica y por la técnica de *Western blot*. Los estudios de carácter inmunocitoquímico permitieron observar los distintos tipos de fibras musculares del vientre muscular del músculo tibial anterior de ratón (Figura 22). Los estudios cuantitativos permitieron cuantificar que este

músculo presenta en general una mayor prevalencia (64%) de fibras rápidas (suma del % de IIX, IIX/IIB, IIB).

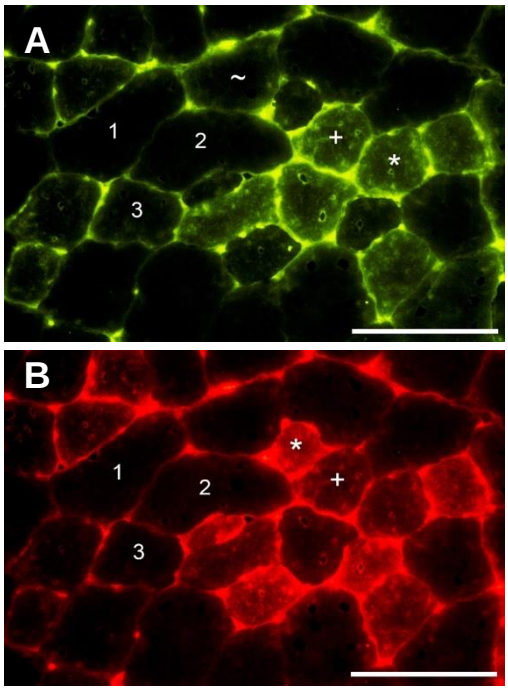

Figura 22: Distribución de las fibras musculares marcadas por técnicas inmunohistoquímica. Imagen de las fibras musculares del músculo tibial anterior del ratón, según la isoforma de MHC. La imagen fue tomada de la zona anterior del vientre muscular. **(A, B**) Cortes sagitales del músculo tibial anterior donde se muestran fibras de tipo IIX en color verde (anticuerpo secundario C*y*2), de las fibras IIA en color rojo (anticuerpo secundario C*y*3) y de las fibras IIB de color negro (no marcadas). (*) indica la fibra pura; (+) indica la hibrida IIA/IIX; (~) indica la isoforma hibrida IIX/IIB; Los números de 1 a 3 indican las mismas fibras musculares. Barra de calibración = 100 µm.

Tras analizar la prevalencia de los tipos de fibras después de las 15 sesiones de NMES, no se observaron cambios significativos en ninguna isoforma específica, sin embargo, se percibe una tendencia a una mayor prevalencia del fenotipo de fibras IIA, IIX y IIX/IIB. También se apreció una disminución de la cantidad de fibras IIB y I (Figura 23).

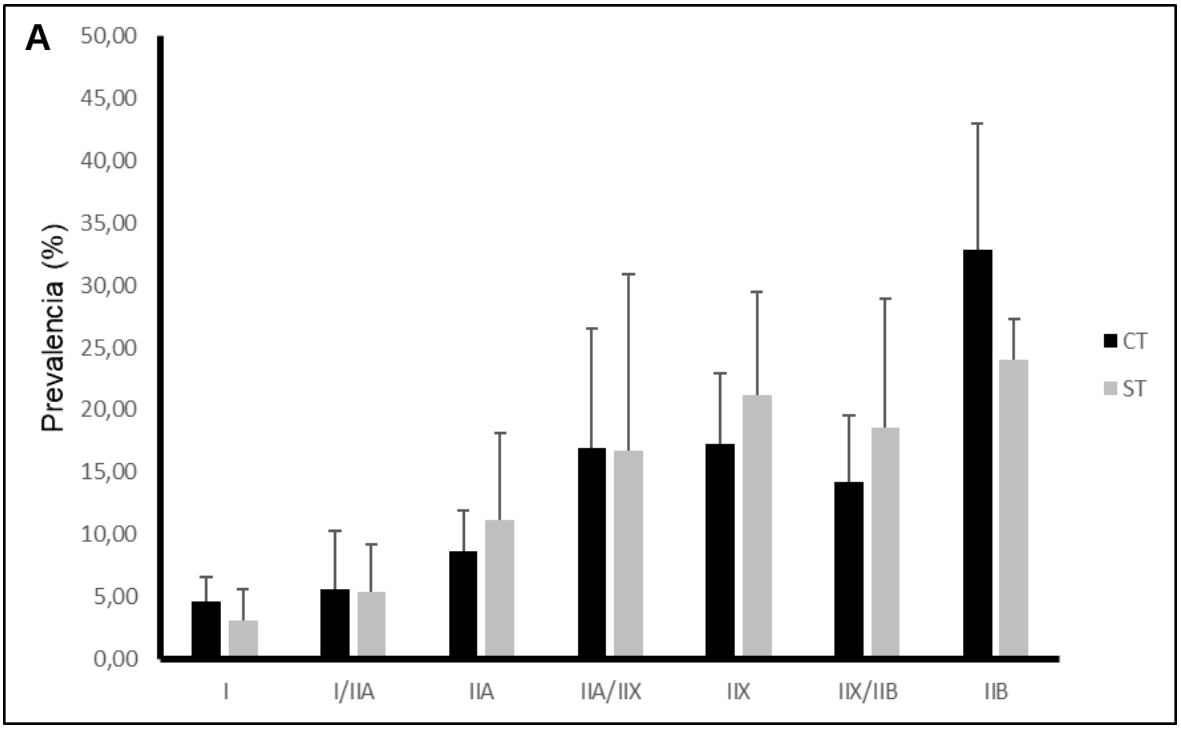

Figura 23: Distribución de las fibras musculares marcadas por técnicas inmunohistoquímica. Proporción de fibras según la isoforma de MHC de la zona anterior del vientre muscular del músculo tibial anterior de ratones controles (CT) y ratones sometidos a electroestimulación (ST).

Al analizar el contenido total de proteína de MHC, así como el contenido específico de la isoforma IIB mediante *Western Blot*, no se apreciaron cambios en la expresión total de MHC, sin embargo, se observó un aumento no significativo en el contenido de IIB para el grupo estimulado (Figura 24).

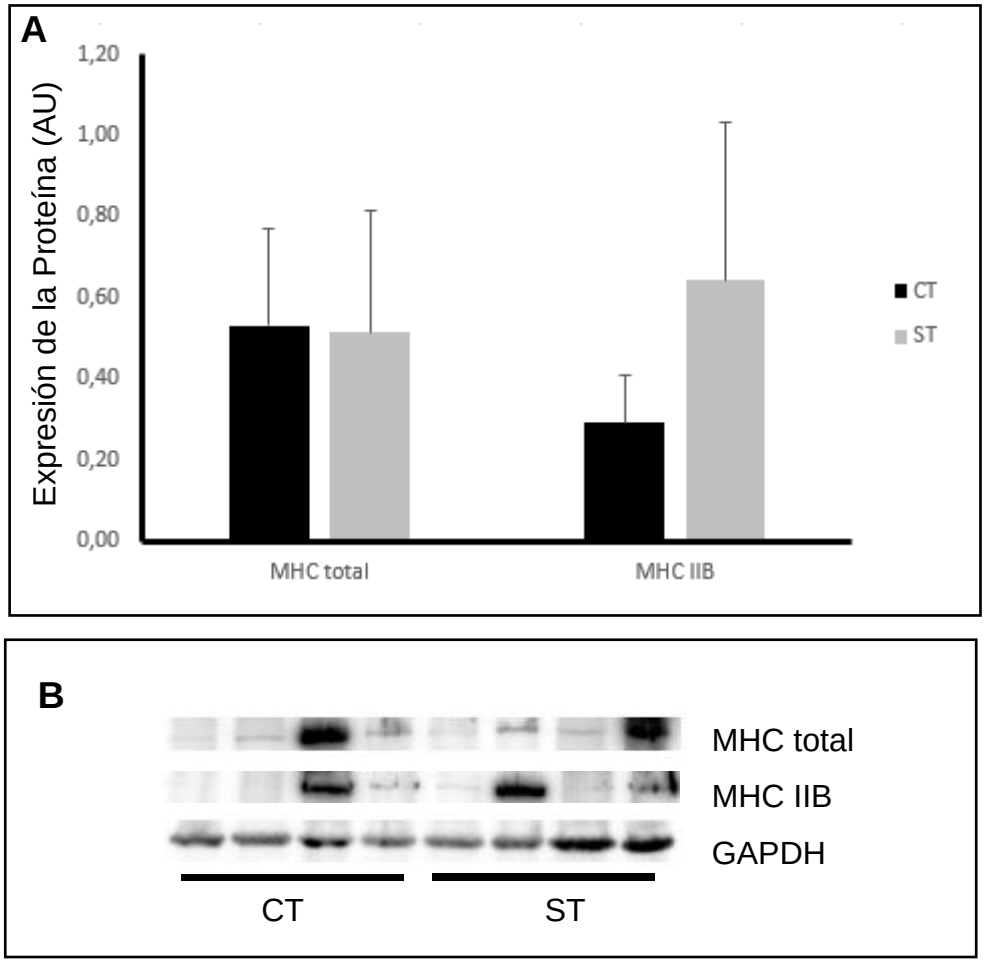

Figura 24: **Expresión del contenido protéico de tras la electroestimulación neuromuscular.** (A) Expresión de la proteína total de MHC tras 15 sesiones de electroestimulación neuromuscular (en unidades arbitrarias, AU). Se apreció un aumento, no significativo, de la expresión de proteínas de MHC IIB. (B) Muestras de *Western blot* para MHC total, MHC IIB y GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Los valores corresponden a medias ± desviación estándar

Adaptaciones Angiogénicas, Miogénicas y del Tejido Conectivo por Efecto de la Electroestimulación

En una serie de experimentos se procedió al marcaje selectivo de capilares sanguíneos, mionúcleos y células satélites en secciones de músculo tibial anterior de ratón (Figura 25).

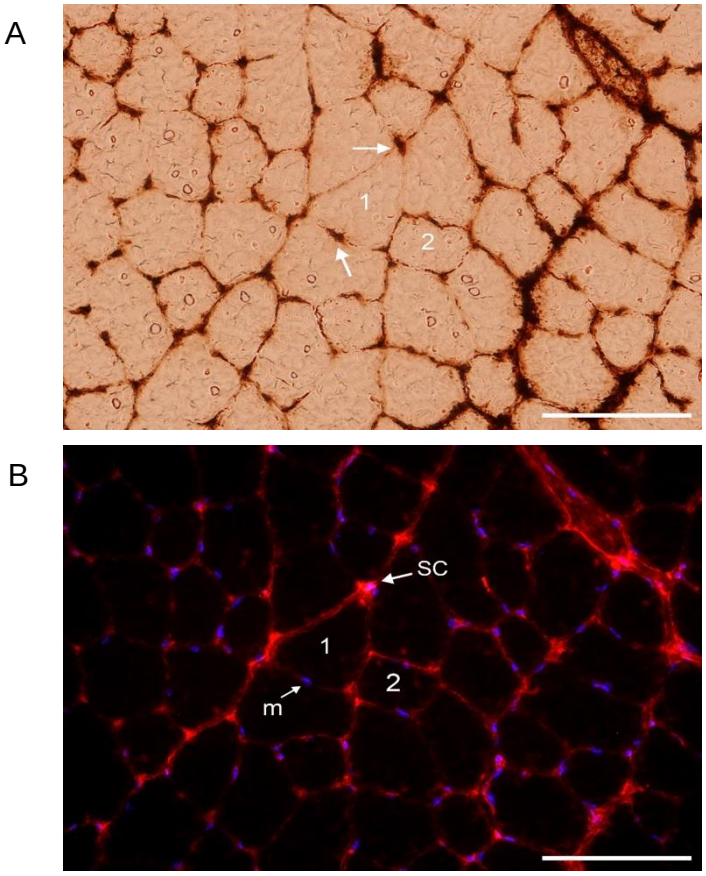

Figura 25: Marcaje de los capilares musculares, mionúcleos y células satélites por técnicas inmunohistoquímicas. Imágenes demostrativas de la tinción de capilares, núcleos y células satélite en secciones trasversales de músculo tibial anterior de ratón. **(A)** Marcaje de capilares, mostrados como puntos negros marcados en el perimisio (flechas blancas); **(B)** Marcaje nuclear mediante DAPI (azul). Dichos núcleos fueron considerados mionúcleos ('m') si el marcaje estaba dentro de la lámina basal. Marcaje de células satélite por PAX7 (rojo). Las células satélites se identificaron por la colocalización de DAPI y PAX7 morado) junto a la lámina basal. Los números '1 y 2' indican las mismas fibras musculares en ambas imágenes. (Barra= 100 µm)

Por efecto de la electroestimulación neuromuscular no se encontraron diferencias significativas en las propiedades angiogénicas y miogénicas de las fibras musculares, tras 15 sesiones de electroestimulación. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en números de células satélites y capilares para el grupo que sufrió la electroestimulación, mientras que se observó una disminución de

mionúcleos por área. Asimismo, no se observaron cambios en la cantidad de tejido conectivo (Figura 26).

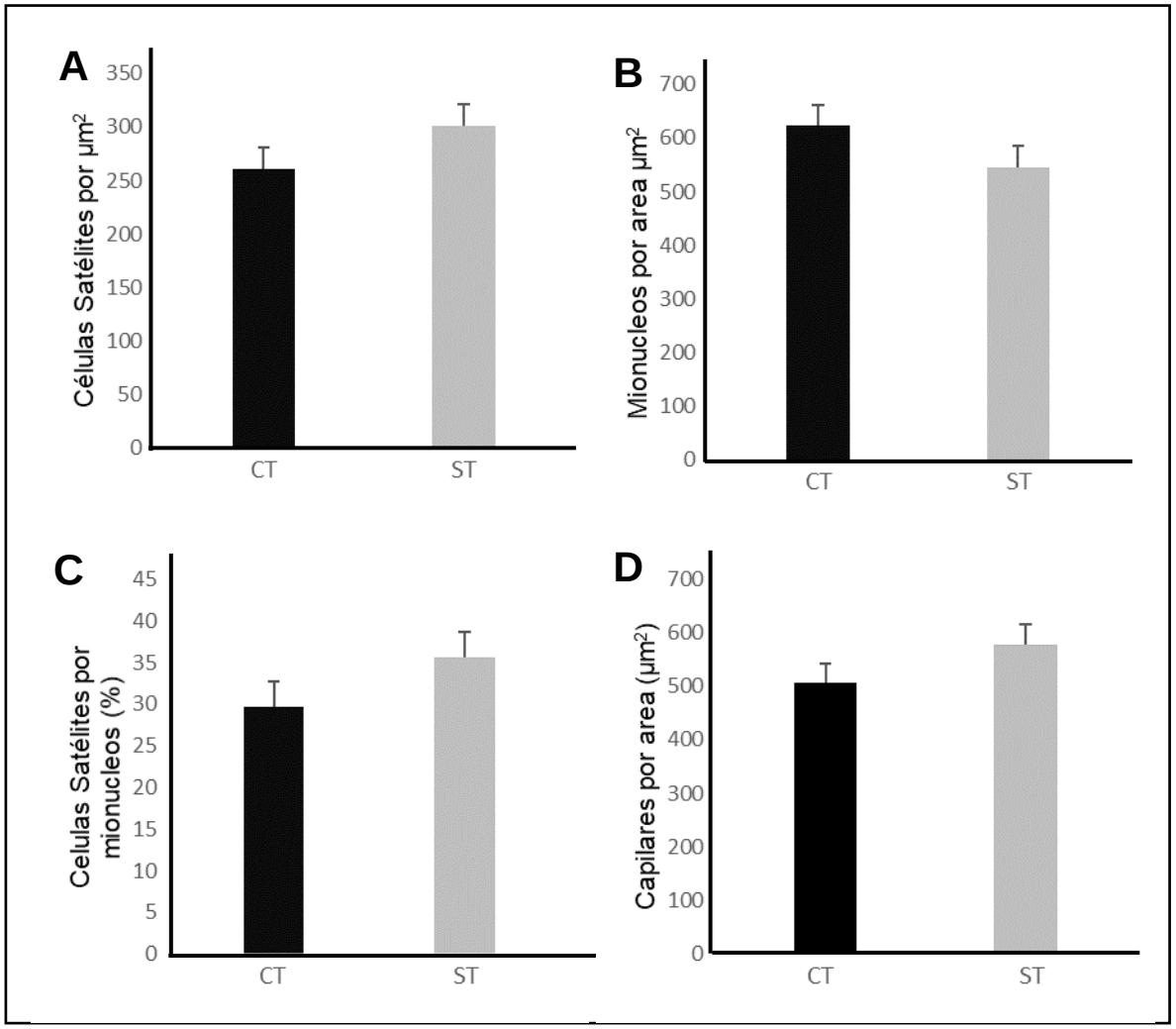

Figura 26: Variaciones en la capilarización, número de núcleos y células satélites por efecto de la electroestimulación neuromuscular. Relación de células satélite **(A)**, mionúcleos **(B)** y capilares **(D)** por área de sección muscular (µm^2) en músculos control (CT) y músculos sometidos a electroestimulación (ST). **(C)** Proporción de células satélite con respecto al número de mionúcleos. Los valores corresponden a medias ± desviación estándar.

CAPITULO 2: ELECTROESTIMULACIÓN TRANSCRANEAL

¿Un protocolo de ocho sesiones de electroestimulación transcraneal puede conseguir cambios conductuales relacionados con la alimentación y una consecuente pérdida de peso?

Participantes

Un total de 68 participantes fueron inicialmente convocadas para su participación en el estudio. De las 68 participantes, catorce no cumplieron los criterios de inclusión/exclusión, cuatro declinaron su participación, ocho no tuvieron disponibilidad de tiempo, y dos no devolvieron las llamadas telefónicas. Un total de 40 participantes fueron aleatorizadas. Dos participantes del grupo control fueron excluidas durante el estudio por no poder cumplir con el protocolo. Finalmente, la muestra fue de 38 participantes (n = 18 controles, n = 20 activos).

La **Tabla 5** muestra las características basales, donde se indica la edad, Índice de Masa Corporal (IMC), adiposidad y comportamiento relacionado con la alimentación en ambos grupos de participantes.

Tabla 5.
Características basales de las participantes de ambos grupos

	Control (n=18)	**Activo** (n=20)	***p* valor**
Edad (años)	51.8 (1.3)	53.1 (1.3)	0.447 [a]
Peso Corporal (kg)	82.6 (2.9)	81.6 (2.3)	0.783 [a]
Altura (cm)	160.6 (1.8)	160.7 (1.5)	0.933 [a]
IMC (kg/m^2)	31.9 (0.7)	31.5 (0.6)	0.683 [a]
Adiposidad (% grasa BIA)	42.3 (0.9)	41.8 (0.9)	0.691 [a]
TFEQ – R18			
Restricción Cognitiva	15.6 (1.0)	14.8 (0.8)	0.561 [a]
Desinhibición	28.8 (1.1)	27.9 (1.1)	0.692 [b]
La susceptibilidad al hambre	9.6 (0.4)	9.7 (0.5)	0.731 [b]
FCQ - T			
F1: Intención y planes para comer	17.1 (1.4)	18.7 (1.4)	0.401 [a]
F2: Anticipación del refuerzo positivo que puede resultar de comer	9.9 (0.8)	10.6 (0.9)	0.532 [a]
F3: Anticipación del alivio de estado y sentimientos negativos como resultado de comer	9.2 (0.9)	10.2 (0.9)	0.317 [b]
F4: Falta de controle al comer	15.5 (1.0)		
F5: Pensamientos o preocupación por la comida	19.4 (2.1)	15.9 (1.2) 19.9 (1.8)	0.874 [b] 0.553 [b]
F6: Ansia como estado fisiológico	14.7 (1.1)		
F7: Emociones que se puede experimentar antes o después del ansia por comer	21.2 (1.9)	15.9 (1.0) 22.2 (1.7)	0.228 [b] 0.671 [a]
F8: Señales que pueden desencadenar ansia por la comida	15.1 (1.1)	16.4 (1.1)	0.414 [a]
F9: La culpa por los antojos y/o por ceder a ellos	13.4 (0.9)	14.0 (1.0)	0.426 [b]
Puntuación Total	135.4 (9.7)	144.1 (8.9)	0.377 [b]

Media (Desviación estándar). [a] *t test* para muestras independientes; [b] *Mann-Whitney test*

Efectos Sobre el Peso Corporal

El resultado primario del estudio mostro que las modificaciones en el peso corporal seguían un modelo lineal mixto, que resultó ser significativo para todo el grupo a lo

largo del estudio (p = 0,020). Específicamente, se observó que en el grupo activo se produjo una mayor reducción del peso corporal que en el grupo control (Figura 27A). También se observó una mayor reducción de peso corporal en el grupo activo en la semana 3 (p = 0,024) y en la semana 4 (p = 0,002). En la semana 4 (final del estudio), el grupo activo había perdido 2,32 ± 0,35% del peso corporal inicial, frente al 1,29 ± 0,26% en el grupo control, lo que indica un beneficio neto medio del 1,03% en el grupo activo. Durante las semanas 1 y 2 solo se observó cierta tendencia (p = 0,105-0,110). El análisis de los cambios semanales mostró que los participantes del grupo activo tenían una reducción del peso corporal, detectable desde el final de la primera semana, durante la cual solo recibieron tDCS, que perduró todas las semanas del estudio (p <0.05, t-test de *Student*) (Figura 27B). Por el contrario, el grupo control sólo mostró una reducción transitoria de peso al comienzo de la dieta (semana 2).

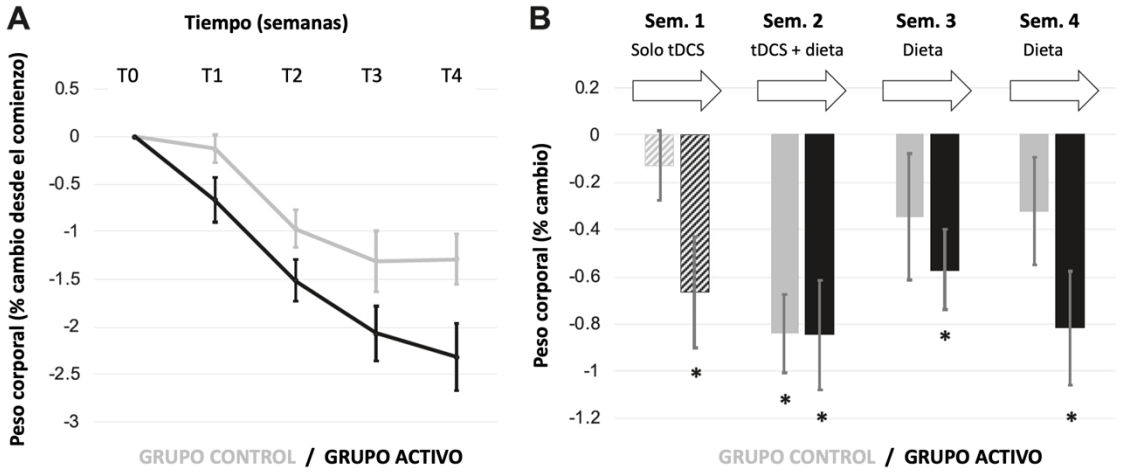

Figura 27: Efecto de la tDCS sobre el peso corporal. (**A**). Cambios en el peso corporal a lo largo del estudio. Los valores indican el porcentaje medio (media ± SEM) de cambio en el peso corporal desde la línea de base, correspondiente al grupo control (línea gris) y al grupo activo (línea negra). Las participantes del grupo activo perdieron más peso (p = 0,020, modelo lineal mixto). (**B**) Cambios semanales en el peso corporal. Las barras indican el porcentaje medio (media ± SEM) de cambio en el peso corporal para el grupo control (línea gris) y para el grupo activo (línea negra). Las barras de rayas representan los datos de la semana 1 (tDCS solamente). Las barras rellenas representan los datos de la semana 2 (tDCS + dieta), así como los de las semanas 3 y 4 (solo dieta). Los datos mostrados corresponden a los resultados semanales obtenidos restando el % de pérdida del peso

corporal a lo largo de una semana determinada de la semana anterior. * p <0,05, t-test de *Student.*

Efectos Sobre el Apetito

El análisis del cambio en el apetito, durante las dos semanas de estimulación mediante tDCS reveló que el grupo activo tenía una menor apetencia alimentaria que el grupo control, aunque la diferencia entre ambos grupos no llegó a ser significativa (p = 0,062, modelo lineal mixto). No se apreció ningún efecto sobre la sensación de hambre, plenitud o necesidad potencial de consumo. La Figura 28A muestra el cambio acumulativo al final de la primera semana, en la que los sujetos solo habían recibido tDCS, y al final de la segunda semana, en la que habían recibido tDCS más dieta, para las cuatro preguntas del cuestionario sobre el apetito. La máxima diferencia entre grupo activo y grupo control parecía estar al final de la primera semana.

Efectos sobre el Ansia de Comer

No hubo diferencias significativas entre los grupos activo y control en relación con ansia de comida (p = 0,3). Sin embargo, el grupo activo experimentó una reducción significativa del factor 3 (sentimiento de alivio como resultado de la ingesta) (p = 0.044, modelo lineal mixto). Las diferencias entre grupos para este factor fueron significativas (p <0.05) al final de las semanas 1 y 4. La Figura 28B muestra los cambios en las puntuaciones de ansia de alimentos al final de la semana 1 (cuando habían recibido solo tDCS) y al final de la semana 4 (final de el estudio) para todos los factores del cuestionario.

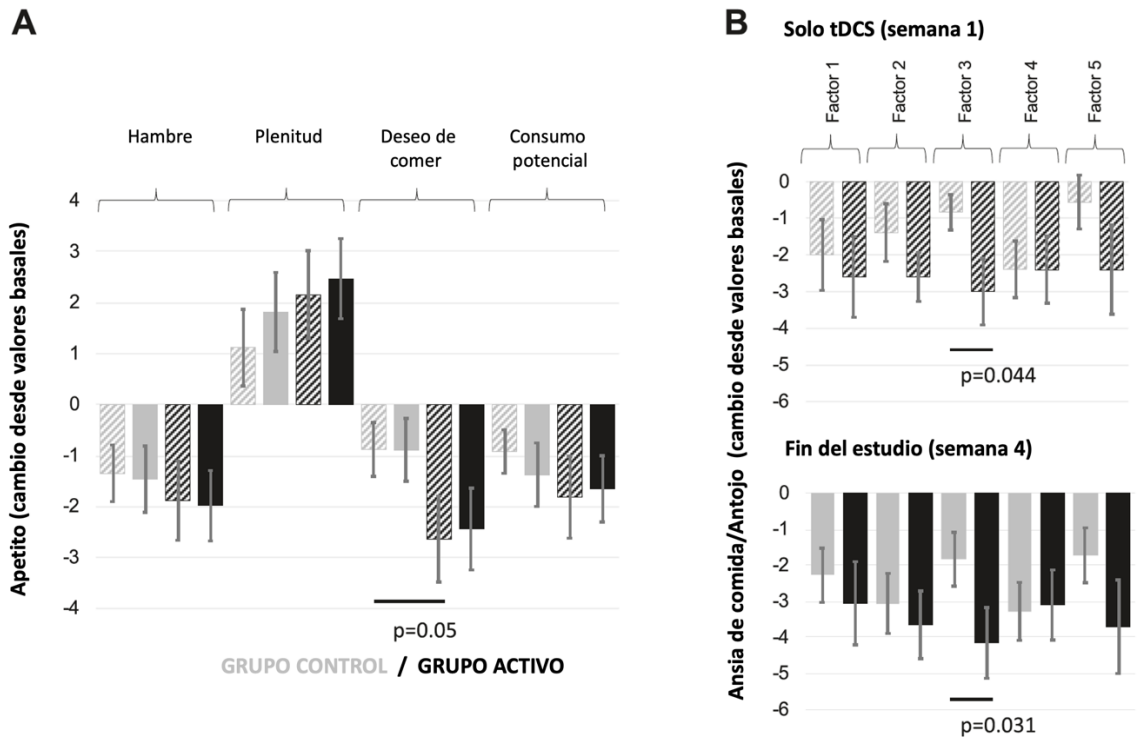

Figura 28: Efectos de tDCS sobre el apetito y ansia de comida. (**A)** Cambios en puntuaciones de la evaluación del apetito "EVA". Las barras indican los valores medios (media ± SEM) para el grupo control (línea gris) y el grupo activo (línea negra) Las barras de rayas representan los datos de la semana 1 (solo tDCS). Las barras llenas representan los datos de la semana 2 (tDCS + dieta). Las preguntas a las que hace referencia el cuestionario se muestran en la parte superior de la gráfica. (**B**) Cambios en la puntuación del ansia de alimentos. Las barras indican cambios en las puntuaciones para los factores 1-5 en la semana 1 y en el final del estudio (semana 4). Los datos se muestran como media ± SEM para el grupo control (línea gris) y para el grupo activo (línea negra). Las barras de rayas representan los datos de la semana 1 (solo tDCS). Las barras llenas representan los datos de la semana 4 (solo dieta) datos. Los valores de p corresponden a diferencias en valores mínimos cuadráticos.

Efectos Neurocognitivos

La **Tabla 6** muestra los resultados detallados en la realización de las tareas neurocognitivas para las tres tareas evaluadas. El grupo activo mostró mejoras en el desempeño de las tareas que fueron más selectivas para medidas de precisión. La tarea que experimentó un mayor beneficio fue la tarea de *Go / No Go*, donde el grupo activo experimentó un mayor rendimiento en todas las medidas.

Se examinó si los cambios en el rendimiento neurocognitivo, indicativo de compromiso, podría predecir cambios posteriores en los principales resultados del estudio (peso corporal, antojo por la comida y apetito). Dicho examen permitió observar una asociación entre el control inhibitorio y el ansia de comida, que fue selectiva para el grupo activo. Específicamente, la mayor velocidad de respuesta en la tarea Go / No-Go tuvo una correlación positiva con una mayor reducción en el ansia de comida a lo largo del estudio (puntuación total y factores 1, 4 y 5) (p = 0,006-0,048, correlación de *Spearman*).

El análisis de regresión múltiple mostró que los cambios en la velocidad y la tasa de error durante la tarea Go / No-Go era capaz de explicar el 43,5% de diferencia en el cambio del factor 4 (falta de control para comer en exceso) al final del estudio. Los cambios en el rendimiento neurocognitivo estaban asociados al efecto observado sobre el apetito y sobre el peso corporal.

Tabla 6.
Tareas neurocognitivas

	Control (n=18)			**Activo** (n=20)		
	Pre	Post	*p* value	Pre	Post	*p* value
Tarea *Go / No-Go*						
Errores de Comisión (%)	9.4 (1.5)	8.3 (1.6)	0.302 [a]	8.8 (1.0)	7.5 (1.0)	0.369 [a]
Precisión (%)	94.6 (1.1)	94.5 (1.7)	0.687 [a]	93.9 (1.1)	97.1 (0.9)	**0.002 [a]***
Media Go RT (ms)	570.4 (6.1)	572.4 (11.4)	0.879 [a]	567.0 (10.1)	554.0 (7.8)	0.074 [b]
Tarea de 2 vueltas						
Precisión (%)	84.6 (3.7)	90.4 (2.9)	0.210 [a]	81.6 (3.8)	93.8 (1.4)	**0.001 [a]***
Media RT (ms)	528.6 (12.3)	505.7 (12.1)	**0.028 [a]***	512.1 (16.1)	481.8 (10.5)	**0.013 [b]***
Tarea Dual						
Errores de Comisión (%)	3.4 (0.7)	4.8 (1.2)	0.478 [a]	3.2 (0.4)	2.4 (0.5)	**0.021 [a]***
Precisión (%)	85.1 (4.6)	89.9 (2.2)	0.460 [a]	89.9 (2.5)	93.5 (1.8)	**0.031 [a]***
Media RT (ms)	541.6 (16.0)	536.1 (12.1)	0.753 [b]	502.0 (12.1)	484.3 (11.3)	**0.007 [b]***

Media (Desviación estándar). [a] *t test* para muestras pareadas; [b] *Wilcoxon test*; * Diferencias significativas ($p < 0.05$)

Efectos Adversos

En general, la intervención fue bien aceptada y tolerada por las participantes y ninguna de ellas decidió abandonar el estudio por dichos efectos. No se observaron efectos adversos significativos o inesperados. Algunas participantes informaron sobre síntomas transitorios, leves o moderados, comúnmente encontrados en los estudios de tDCS, sin que se evidenciasen diferencias entre el grupo control y el grupo activo (**Tabla 7**). El enrojecimiento de la piel tendía a ocurrir con mayor frecuencia en las participantes del grupo activo que en el grupo control (75% frente a 44,4%, p = 0,054, chi-cuadrado de *Pearson*).

Tabla 7.
Efectos adversos

	Control (n=18)	**Activo** (n=20)	***p* value**
Dolor de cabeza	2 (11.1)	7 (35)	0.130 [a]
Dolor en el cuero cabelludo	1 (5.6)	2 (10.0)	1.000 [a]
Sensación de ardor / quemadura del cuero cabelludo	11 (61.1)	12 (60.0)	0.944 [b]
Dolor de cuello	0 (0.0)	1 (5.0)	1.000 [a]
Hormigueo	16 (88.9)	18 (90.0)	1.000 [a]
Enrojecimiento de la piel	8 (44.4)	15 (75.0)	0.054 [b]
Somnolencia	4 (22.2)	8 (40.0)	0.307 [a]
Dificultad para concentrarse	2 (11.1)	1 (5.0)	0.595 [a]
Cambio de humor	0 (0.0)	2 (10.0)	0.488 [a]

Media (Desviación estándar). [a] Prueba exacta de *Fisher*; [b] *test* de *Chi* cuadrado.

DISCUSIÓN

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: EFECTIVIDAD DE LA ELECTROESTIMULACIÓN NEUROMUSCULAR SOBRE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL MÚSCULO

De manera resumida, los resultados del estudio realizado en animales de experimentación demuestran que, 15 sesiones de NMES de alta frecuencia (100 Hz) son capaces de producir cambios neuromusculares y moleculares en músculo estriado de ratones C57BL/6J. Cambios que se ven reflejados principalmente en las propiedades contráctiles del músculo Tibial Anterior.

Características y Función Muscular

El sistema musculoesquelético presenta una importante capacidad de adaptación frente a diversos estímulos, resultando en una mejoría en la capacidad metabólica y en el rendimiento físico. Tal y como muestran los datos ilustrados en el apartado anterior (Resultados - *Características de los ratones y de músculo*), las 15 sesiones de NMES fueron suficientes para inducir un incremento significativo en la masa muscular y en el FCSA del TA, sugiriendo una hipertrofia muscular.

Este resultado corrobora con un estudio previo realizado en este mismo laboratorio (86) y con otros estudios realizados en roedores (115-117). Diversos autores demuestramos, de forma concluyente que, la hipertrofia muscular inducida por ejercicio de fuerza, contracción voluntaria o estimulación mediante NMES, es completamente dependiente de la mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), siendo la PI3K (fosfatidilinositol- 3-kinasa) – Akt – mTOR la vía responsable por el control de síntesis y decomposición de proteínas (52,116,118-123). Esta vía produce un aumento anabólico de la fosforilación de la proteína ribosómica S6 quinasa ($p70^{S6k}$), que puede ser la principal proteína responsable para la hipertrofia musculoesquelética (120,124). En este sentido, el entrenamiento

crónico regula numerosos genes que son importantes para la biosíntesis del sistema musculoesquelético y lo hace a través del control de la degradación de RNAm (125). Esto ocurre como un mecanismo de adaptación a largo plazo frente a los estímulos repetidos.

En este estudio también se ha visto un incremento significativo en la fuerza máxima tetánica evocada por contracción eléctrica, así como su tasa de desarrollo, resultados semejantes a los de otros estudios realizados en roedores (27,82,115). Muchos son los factores que pueden interferir las propiedades contráctiles del músculo, como las propiedades intrínsecas del mismo, la composición del tipo de fibra muscular o los mecanismos neuronales. Estudios anteriores justifican este aumento de fuerza muscular a través de algunas hipótesis: 1) la masa muscular y/o el FCSA es proporcional a la fuerza ejercida y su aumento ocurre como resultado de contracciones repetitivas y crónicas (126-128); 2) como respuesta fisiológica a la activación del proceso de regeneración del tejido muscular esquelético (118); 3) debido a la combinación de las mejoras en la activación neuronal (mejor sincronización de los patrones de disparo de la unidad motora), tamaño de la fibra muscular y rigidez del tejido conectivo (126); 4) aumento en el contenido de la isoforma de la MHC IIA (38,54,126,127). Todos estos mecanismos e hipótesis podrían haber participado en la mejora de estas propiedades contráctiles. Además, estos resultados respaldan la afirmación de que la producción de fuerza es proporcional a la frecuencia e intensidad de la NMES, bajo la hipótesis de que hay un mayor reclutamiento de unidades motoras (2,38,46,82,129-131).

A diferencia de otros estudios, nuestra investigación ha mostrado una mejoría significativa en el tiempo de fatiga. Este resultado no era esperado, dado que la mayoría de los estudios convergen en que la NMES de alta frecuencia es caracterizada por una mayor demanda metabólica resultado de contracciones musculares repetidas y del patrón no selectivo de reclutamiento de unidades motoras (46,130-133). Sin embargo, las posibles explicaciones que se puede dar para este resultado se basan en la angiogénesis (82,134,135) y/o en el aumento del contenido de la isoforma MHC IIA (54).

Distribución de MHC

En este estudio se ha observado una tendencia a la transición de la isoforma hacia un fenotipo rápido e intermedio (MHC I › MHC IIA — MHC IIX ‹ MHC IIB) observado por inmunohistoquímica, y un aumento de la expresión del contenido de la proteína MHC IIB, pensamos que debido el aumento de la isoforma hibrida MHC IIX/IIB. La alteración de la composición de la isoforma de MHC es uno de los principales mecanismos de adaptación muscular frente al ejercicio y ocurre debido al aumento de la actividad neuromuscular, al reclutamiento de diferentes unidades motoras, metabolismo energético y respuestas hormonales. No obstante, estos cambios son dependientes del tipo de entrenamiento y grupos musculares (54). La explicación más probable de estos hallazgos se basa en que las alteraciones de la composición de isoformas de MHC fueron inducidas por factores mecánicos (por ejemplo, el estrés) como consecuencia a la frecuencia utilizada en la NMES, creyéndose que la alta frecuencia produjo un máximo reclutamiento de unidades motoras. Además, hay evidencias de que los mecanismos neuronales juegan un papel importante en la determinación del fenotipo de la musculatura esquelética, así como de las adaptaciones neuromusculares frente al ejercicio (29,37,43,54,127,136,137).

El aumento, aunque no significativo, de la isoforma MHC IIX coincide con el estudio de Caiozzo y colaboradores (137) realizado en roedores, pero que diverge de estudios realizados en humanos (54,118,138). La posible explicación para esta divergencia se basa en que la isoforma MHC IIX humana no posee las mismas características funcionales y morfológicas de los ratones (Ver tabla 1, Introducción) (29).

Células Satélites y Dominio Mionuclear

Al analizar la distribución de células satélites no hemos observado un aumento significativo tras 15 sesiones de NMES de alta frecuencia. Estudios previos encontraron resultados semejantes a este. Hikida y colaboradores, analizan los

efectos de 16 semanas de un entrenamiento de fuerza en humanos y no encuentran aumento significativo en el número de células satélites tras 8 y 16 semanas de ejercicio. Roth y colaboradores (139) también analizaron la expresión de células satélite tras 9 semanas de un entrenamiento de fuerza y encontraron un modesto aumento, aunque significativo. Los estudios que observaron la respuesta miogénica temprana, demostraron que hay un aumento significativo de células satélite tras 24h de ejercicio (140) y tras 4 y 8 días de entrenamiento de fuerza (141). La explicación para estos resultados se basa en que las células satélite alcanzan su mayor actividad en las primeras semanas de entrenamiento (139,142), incluso, en los primeros días (140,141). Para que ocurra la activación de las células satélite es necesario que haya un daño muscular; en este caso fue producido como consecuencia a la NMES de alta frecuencia. Una vez ocurre su activación, un cierto porcentaje de células satélite regresan al grupo de células inactivas, mientras que otras pasan por diversos ciclos de proliferación, y, finalmente se fusionan para formar nuevas fibras musculares (proceso de diferenciación celular) (143,144). Cuando empieza el proceso de proliferación de las células satélite (ahora denominadas mioblastos), hay una considerada disminución de la expresión de la proteína Pax7 y una vez las células satélite se diferencian dejan de expresarla (144). Asimismo, Guerra Hernández menciona que los estímulos recurrentes son los que incitan el proceso de diferenciación de las SC (145).

En relación con el número de mionúcleos, este estudio no ha encontrado cambios significativos en el mismo, y se ha encontrado una ligera disminución de estos. La principal explicación para esta ligera disminución se basa en el tipo de corte realizado para el análisis de esta variable, corte transversal, donde la mayoría de los estudios que analizan los mionúcleos realizan cortes longitudinales (146-149). Sin embargo, también existe un extenso debate sobre si es posible que haya hipertrofia sin que ocurra cambios en el número de células satélite y mionúcleos (150). Algunos autores comentan que el dominio mionuclear (número de mionúcleos por FCSA) está inversamente relacionado con la capacidad oxidativa de las fibras musculares (146), es decir, las fibras de contracción rápida presentan menos

mionúcleos por fibra, siendo este tipo de fibra la de mayor prevalencia en este estudio. Esto ocurre debido a que las fibras glucolíticas requieren una capacidad transcripcional menor comparada a las oxidativas (151). Asimismo, posiblemente el crecimiento de la fibra muscular encontrada en este estudio no fue suficiente para alcanzar el umbral que se requiere para la adición de mionúcleos (152).

Sabiéndose esto, y puesto que el presente estudio analizó la expresión de células satélite tras 15 sesiones de NMES (5 semanas), se puede especular que la activación de las células satélite ocurrió en un período antes de la 5ª semana, y que pasado las 15 sesiones algunas células satélites ya se encontraban en proceso de diferenciación.

Angiogénesis

En nuestro estudio no se han encontrado cambios significativos en lo que se refiere a los capilares, aunque, se ha observado un ligero aumento de estos. Posiblemente esto se debe a que el protocolo utilizado en este estudio fue capaz de producir un ligero aumento en la perfusión microvascular del tejido musculoesquelético, debido al aumento de la demanda metabólica provocada por las contracciones repetidas y por el aumento de las fibras tipo IIA que presentan mayor capacidad oxidativa que las demás fibras rápida (82,134).

Estudios anteriores demuestran que la NMES, al producir un aumento en la carga física a través de las contracciones musculares, puede llegar a activar múltiples sistemas, como puede ser el sistema cardiovascular (126,153,154). Asimismo, la NMES es capaz de producir cambios mecánicos y metabólicos en el músculo, así como, aumentar la actividad nerviosa simpática activando el centro vasomotor que puede resultar en un incremento del gasto cardíaco, constricción de los vasos periféricos y elevación de la presión arterial sistémica (126,155).

ENSAYO CLÍNICO: EFECTIVIDAD DE LA CORRIENTE CONTINUA TRANSCRANEAL SOBRE EL CONTROL DEL APETITO Y PÉRDIDA DE PESO.

En este estudio se analizó los efectos a corto plazo de la tDCS aplicado en la corteza frontoparietal dorsal izquierda combinado con una dieta hipocalórica en mujeres de mediana edad con sobrepeso / obesidad de clase I.

Se encontró que la tDCS activo causó más reducción del peso corporal durante todo el estudio que la tDCS simulado/placebo. Este hallazgo se vio reflejado en las mejoras significativas en las medidas objetivas del rendimiento cognitivo y las reducciones de nivel de tendencia en las medidas subjetivas de apetito y antojo de alimentos. También se ha visto que las mejoras en el rendimiento del control inhibitorio predijeron reducciones en la falta de control sobre la alimentación en el grupo activo. En general, este estudio proporciona evidencia de que la tDCS tiene el potencial de facilitar la pérdida de peso en mujeres de mediana edad, a través de la mejora de los procesos neurocognitivos relacionados con la regulación conductual de la ingesta de alimentos.

Este estudio amplía los resultados de ensayos previos que sugieren que la tDCS aplicado sobre la corteza frontoparietal dorsal izquierda puede conducir a una reducción del peso corporal y la ingesta de alimentos (156,157). Específicamente, se identificó un efecto beneficioso para la tDCS activo administrado como una intervención ambulatoria que tiene similitudes con el uso común para tratar la obesidad en la práctica clínica. Una diferencia clave con respecto a estudios anteriores es el perfil de los participantes, que era una muestra muy homogénea de mujeres de mediana edad, blancas y amables, que reflejaban la demografía predominante de Alcalá de Henares. Se desconoce si estos hallazgos pueden extrapolarse a otras poblaciones y datos demográficos. Un estudio previo en una muestra diversa de 23 hombres y mujeres encontró que 15 sesiones de tDCS activo aplicado al DLPFC izquierdo no afectaron significativamente el peso corporal, pero

hubo una reducción en el consumo de hambre y tentempiés bajo saciedad (157). Además, el análisis preliminar de otro ensayo con tDCS en obesidad en mujeres jóvenes sugiere una influencia de la variabilidad genética relacionada con el estado de dopamina (158). En conjunto, estos hallazgos parecen apuntar a diferentes perfiles de respuesta a tDCS, con un beneficio potencial para las mujeres de mediana edad, una observación que debería examinarse en detalle en futuros estudios más amplios.

Estos hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos neurocognitivos, es decir, subyacentes a los efectos de los tDCS aplicados a corteza frontoparietal dorsal en la obesidad. Se descubrió que los sujetos que recibieron tDCS activo tenían una mejor precisión de rendimiento en tareas neurocognitivas que evaluaban procesos relacionados con corteza frontoparietal dorsal. De acuerdo con estos datos, dos investigaciones previas que examinaron los efectos agudos de tDCS en el antojo de alimentos informaron cambios neuroeléctricos indicativos de un mejor procesamiento de las respuestas inhibitorias en las regiones frontomediales (159) y la reducción en la captura de atención de alimentos detectada mediante el seguimiento ocular (160). Aquí, por primera vez, se encontró una asociación entre las mejoras en el control inhibitorio y la reducción en las medidas de antojo de alimentos, lo que indica que tDCS mejoró los circuitos cerebrales subyacentes relacionados con el control cognitivo del comportamiento alimentario que se tradujo en una mejor capacidad para resistir la influencia de las señales de los alimentos. Sin embargo, los cambios en el control inhibitorio no se relacionaron con la pérdida de peso, posiblemente debido a la duración limitada del estudio y los contribuyentes adicionales al resultado final. A nivel conductual, hay evidencia de un efecto selectivo de tDCS en el consumo de alimentos sabrosos (156), comer en ausencia de hambre (157) y ansia de dulce (161,162). En total, esta evidencia apunta a una imagen emergente de tDCS que afecta predominantemente al hedónico, regulación no homeostática del comportamiento alimentario.

No obstante, este estudio tiene una serie de limitaciones. Primero, la duración del estudio se limitó a un mes. Por lo tanto, es difícil extrapolar si los cambios

identificados en el peso corporal persistirán, aumentarán o se estabilizarán con el tiempo. Un estudio anterior demostró que una semana de tDCS puede causar una reducción en el estado de antojo de alimentos que puede durar hasta un mes después de la estimulación (163). Sin embargo, actualmente no hay datos que respalden un efecto duradero sobre el peso. En segundo lugar, no se analizó los efectos directos sobre el objetivo cerebral. Los estudios futuros deberían integrar la neuroimagen funcional para comprender mejor la conexión entre el compromiso del objetivo cerebral, el comportamiento y los efectos clínicos. Esto es particularmente importante para el caso de la obesidad, ya que el trabajo con un modelo computacional identifica la grasa subcutánea alrededor de la cabeza como una influencia potencial, aunque insignificante, en la distribución de densidad de corriente tDCS (164). En tercer lugar, no se medió la ingesta de alimentos en este estudio y, por lo tanto, no podemos decir si los resultados pueden indicar diferentes grados de adherencia a la dieta. Por último, no se rastreó objetivamente el cumplimiento del requisito de mantener constantes los niveles de actividad física durante la intervención, por lo que es imposible descartar por completo los efectos de los resultados relacionados con los cambios en la actividad física.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y a lo tratado en el apartado de discusión, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. Nuestro estudio proporciona evidencias que apoyan el uso de la electroestimulación como mecanismo para mejorar el rendimiento físico y producir cambios a nivel conductual.

2. El protocolo de electroestimulación neuromuscular sugerido en este estudio se ha demostrado eficaz para producir hipertrofia y mejorar las propiedades contráctiles del músculo.

3. Las 15 sesiones de electroestimulación neuromuscular de alta frecuencia fue capaz de activar la síntesis de proteínas y producir hipertrofia muscular, resultados verificado a través del aumento del área de sección trasversal de las fibras y de la masa muscular, demostrando ser una técnica útil para producir plasticidad neuromuscular.

4. Los resultados demuestran que la electroestimulación neuromuscular aumenta la actividad neuromuscular y promueve la adaptación muscular semejante a la que ocurre con el ejercicio voluntario, visto a través de la tendencia a la transición de las isoformas de la cadena pesada de la miosina y del aumento de células satélite.

5. La estimulación transcraneal de corriente continua (tDCS), cuando es aplicada en la corteza frontoparietal dorsal izquierda, es eficaz para reducir la ingesta de alimentos y facilitar la pérdida de peso aún en la primera semana de intervención.

6. Los resultados evidencian que la tDCS puede mejorar la precisión de rendimiento en tareas neurocognitivas asociadas a la corteza frontoparietal dorsal izquierda.

7. La electroestimulación neuromuscular y la tDCS son técnicas factibles y bien toleradas y demuestran ser eficaces para producir hipertrofia muscular y para el tratamiento de la obesidad y sobrepeso, respectivamente, en la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Chau H. El pez eléctrico y el descubrimiento de la electricidad animal. Elementos: Ciencia y Cultura. 2007; 14(065):49-62.

(2) Benito E, Martínez E. [dir], Sánchez A. [dir]. Combinación simultánea de electroestimulación neuromuscular y pliometría. Un complemento al entrenamiento de velocidad y salto [Tesis Doctoral]. Jaén: Universidad de Jaén; 2013.

(3) Grundfest H. The mechanisms of discharge of the electric organs in relation to general and comparative electrophysiology. Prog Biophys Biophys Chem. 1957; 7:1-85.

(4) Kellaway P. The part played by electric fish in the early history of bioelectricity and electrotherapy. Bull Hist Med. 1946; 20(2):112-137.

(5) Franklin B. An Account of the Effects of Electricity in Paralytic Cases. In a Letter to John Pringle, MDFRS from Benjamin Franklin, Esq; F.R.S. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1757; 50:481-483. doi: https://doi.org/10.1098/rstl.1757.0060.

(6) Moro E. Botella de Leyden. 2015. Available at: http://diarium.usal.es/elenamoro/2015/03/16/botella-de-leyden/. Accessed Nov 12, 2020.

(7) Prieto J, Fernández JC [dir], Oliva A. [dir]. Valoración de los fenómenos de facilitación e inhibición cortical en humanos mediante estimulación magnética transcraneal [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2015.

(8) Bernardi W. The controversy over animal electricity in 18th-century Italy: Galvani, Volta, and others. Rev Hist Sci Paris. 2001; 54(1):53-70. doi: 10.3406/rhs.2001.2108.

(9) Martínez MS. História de la Electroestimulación l Conceptos Básicos de la Electricidad. En: Principios de electroestimulación y terminología electroterapéutica. Bogotá: Centro Editorial Universidad del Rosario; 2006. p. 12-23.

(10) Beveridge AW, Renvoize EB. Electricity: a history of its use in the treatment of mental illness in Britain during the second half of the 19th century. Br J Psychiatry. 1988; 153:157-162. doi: 10.1192/bjp.153.2.157.

(11) Hernández-Fernández T, Gutiérrez L. [dir], Cediel R. [dir], López J. [dir]. Efecto de la electroestimulación muscular abdominal en el caballo [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2016.

(12) Wexler A. Recurrent themes in the history of the home use of electrical stimulation: Transcranial direct current stimulation (tDCS) and the medical battery (1870–1920). Brain Stimul. 2016; 10(2):187-195. doi: 10.1016/j.brs.2016.11.081.

(13) Gilman SL. Electrotherapy and mental illness: then and now. Hist Psychiatry. 2008; 19(3):339-357. doi: 10.1177/0957154X07082566.

(14) Thomas RK, Young CD. A note on the early history of electrical stimulation of the human brain. J Gen Psychol. 1993; 120(1):73-81. doi: 10.1080/00221309.1993.9917863.

(15) Beveridge A, Renvoizet E. Electricity and British psychiatry in the nineteenth century. J Psychopharmacol. 1990; 4(3):145-151. doi: 10.1177/026988119000400309.

(16) Aldini G. Of the nature and general properties of galvanism. En: An account of the late improvements in galvanism, with a series of curious and interesting experiments. 32nd ed. London: Cuthell and Martin, Middle-Row, Holborn, J. Murray; 1803.

(17) Priori A. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. Clin Neurophysiol. 2003; 114(4):589-595. doi: 10.1016/s1388-2457(02)00437-6.

(18) Wexler A. The Medical Battery in The United States (1870-1920): Electrotherapy at Home and in the Clinic. J Hist Med Allied Sci. 2017; 72(2):166-192. doi: 10.1093/jhmas/jrx001.

(19) Greenway J. Nervous Disease and Electric Medicine. En: Pseudo-Science and Society in 19th-Century America. Lexington: University Press of Kentucky; 1987. p. 52-55.

(20) Hirshbein L. Historical essay: electroconvulsive therapy, memory, and self in America. J Hist Neurosci. 2012; 21(2):147-169. doi: 10.1080/0964704X.2011.577393.

(21) Albert DJ. The effect of spreading depression on the consolidation of learning. Neuropsychologia. 1966; 4(1):49-64. doi: 10.1016/0028-3932(66)90020-0.

(22) Albert DJ. The effects of polarizing currents on the consolidation of learning. Neuropsychologia. 1966; 4(1):65-77. doi: 10.1016/0028-3932(66)90021-2.

(23) Dvorkin MA, Cardinali DP, Iermoli RH. Best &Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica.14th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2010.

(24) Chicharro JL, Fernández AV. Control del Movimiento. En: Fisiología del Ejercicio. 3rd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006.

(25) Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Médica.13th ed. Madrid: Elsevier España; 2016.

(26) Maffiuletti NA. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation. Eur J Appl Physiol. 2010; 110(2):223-234. doi: 10.1007/s00421-010-1502-y.

(27) Bloemberg D, Quadrilatero J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. PLoS ONE. 2012; 7(4):e35273. doi: 10.1371/journal.pone.0035273.

(28) Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. Acta Physiol Scand. 2003; 178(4):413-424. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01158.x.

(29) Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol Rev. 2011; 91(4):1447-1531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010.

(30) Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. Am J Physiol. 1994; 267:1723. doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.6.C1723.

(31) Zierath JR, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. PLoS Biol. 2004; 2(10):e348. doi: 10.1371/journal.pbio.0020348.

(32) Lake DA. Neuromuscular electrical stimulation. An overview and its application in the treatment of sports injuries. Sports Med. 1992; 13(5):320-336. doi: 10.2165/00007256-199213050-00003.

(33) Bax L, Staes F, Verhagen A. Does neuromuscular electrical stimulation strengthen the quadriceps femoris? A systematic review of randomised controlled trials. Sports Med. 2005; 35(3):191-212. doi: 10.2165/00007256-200535030-00002.

(34) Vanderthommen M, Duchateau J. Electrical stimulation as a modality to improve performance of the neuromuscular system. Exerc Sport Sci Rev. 2007; 35(4):180-185. doi: 10.1097/jes.0b013e318156e785.

(35) Vanderthommen M, Duteil S, Wary C, Raynaud JS, Leroy-Willig A, Crielaard JM, et al. A comparison of voluntary and electrically induced contractions by interleaved 1H- and 31P-NMRS in humans. J Appl Physiol. 2003; 94(3):1012-1024. doi: 10.1152/japplphysiol.00887.2001.

(36) Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. J Neurophysiol. 1965; 28:560-580. doi: 10.1152/jn.1965.28.3.560.

(37) Gregory CM, Bickel CS. Recruitment patterns in human skeletal muscle during electrical stimulation. Phys Ther. 2005; 85(4):358-364.

(38) Baldwin ERL, Klakowicz PM, Collins DF. Wide-pulse-width, high-frequency neuromuscular stimulation: implications for functional electrical stimulation. J Appl Physiol. 2006; 101(1):228-240. doi: 10.1152/japplphysiol.00871.2005.

(39) Feiereisen P, Duchateau J, Hainaut K. Motor unit recruitment order during voluntary and electrically induced contractions in the tibialis anterior. Exp Brain Res. 1997; 114(1):117-123. doi: 10.1007/pl00005610.

(40) Adams GR, Harris RT, Woodard D, Dudley GA. Mapping of electrical muscle stimulation using MRI. J Appl Physiol. 1993; 74(2):532-537. doi: 10.1152/jappl.1993.74.2.532.

(41) Lewek M, Stevens J, Snyder-Mackler L. The use of electrical stimulation to increase quadriceps femoris muscle force in an elderly patient following a total knee arthroplasty. Phys Ther. 2001; 81(9):1565-1571. doi: 10.1093/ptj/81.9.1565.

(42) Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, et al. Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. J Appl Physiol. 1994; 76(3):1247-1255. doi: 10.1152/jappl.1994.76.3.1247.

(43) Lowe DA, Alway SE. Animal models for inducing muscle hypertrophy: are they relevant for clinical applications in humans?. J Orthop Sports Phys Ther. 2002; 32(2):36-43. doi: 10.2519/jospt.2002.32.2.36.

(44) Herrero A, Vicuña OA, Rábago JC, López JG. Parámetros del entrenamiento con electroestimulación y efectos crónicos sobre la función muscular (II). Archivos de Medicina del Deporte. 2007; 24(117):43-53.

(45) Maya J, Ahobornoz M. Estimulación eléctrica transcutánea y neuromuscular. Barcelona: Elsevier España; 2010.

(46) Gorgey AS, Black CD, Elder CP, Dudley GA. Effects of electrical stimulation parameters on fatigue in skeletal muscle. J Orthop Sports Phys Ther. 2009; 39(9):684-692. doi: 10.2519/jospt.2009.3045.

(47) Vanderthommen M, Depresseux JC, Dauchat L, Degueldre C, Croisier JL, Crielaard JM. Spatial distribution of blood flow in electrically stimulated human muscle: a positron emission tomography study. Muscle Nerve. 2000; 23(4):482-489. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(200004)23:43.0.co;2-i.

(48) Akima H, Kano Y, Enomoto Y, Ishizu M, Okada M, Oishi Y, et al. Muscle function in 164 men and women aged 20-84 yr. Med Sci Sports Exerc. 2001; 33(2):220-226. doi: 10.1097/00005768-200102000-00008.

(49) Martín JMR. Dosificación en electroterapia. Rev Iberoam Fisioter Kinesiol. 2001; 23(2):2-11.

(50) Holcomb WR, Rubley M, Miller M, Girouard T. The Effect of Rest Intervals on Knee-Extension Torque Production with Neuromuscular Electrical Stimulation. J Sport Rehabil. 2006; 15(2):116-124.

(51) Gondin J, Brocca L, Bellinzona E, D'Antona G, Maffiuletti NA, Miotti D, et al. Neuromuscular electrical stimulation training induces atypical adaptations of the human skeletal muscle phenotype: a functional and proteomic analysis. J Appl Physiol. 2011; 110(2):433-450. doi: 10.1152/japplphysiol.00914.2010.

(52) Maffiuletti NA, Zory R, Miotti D, Pellegrino MA, Jubeau M, Bottinelli R. Neuromuscular adaptations to electrostimulation resistance training. Am J Phys Med Rehabil. 2006; 85(2):167-175. doi: 10.1097/01.phm.0000197570.03343.18.

(53) Gondin J, Giannesini B, Vilmen C, Le Fur Y, Cozzone PJ, Bendahan D. Effects of a single bout of isometric neuromuscular electrical stimulation on rat gastrocnemius muscle: a combined functional, biochemical and MRI investigation. J Electromyogr Kinesiol. 2011; 21(3):525-532. doi: 10.1016/j.jelekin.2011.01.006.

(54) Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM. Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. J Appl Physiol. 2003; 94(6):2282-2288. doi: 10.1152/japplphysiol.00830.2002.

(55) Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lømo T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. J Neurosci. 1990; 10(1):153-160.

(56) Lent R. Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. São Paulo: Atheneu; 2005.

(57) Machado A. Estrutura e Função do Córtex Cerebral. En: Neuroanatomia Funcional. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 257-274.

(58) A.D.A.M. Lóbulo cerebral. 2018. Available at: http://trihealth.adam.com/content.aspx?productid=118&pid=6&gid=9549. Accessed Nov 12, 2020.

(59) Santos EA. Las partes del cerebro humano y sus funciones. 2018. Available at: https://www.unprofesor.com/ciencias-naturales/las-partes-del-cerebro-humano-y-sus-funciones-2855.html. Accessed Nov 12, 2020.

(60) Johnston M, Ishida A, Ishida WN, Matsushita HB, Nishimura A, Tsuji M. Plasticity and Injury in the Developing Brain. Brain Dev. 2009; 31(1):1-10. doi: 10.1016/j.braindev.2008.03.014.

(61) Pimienta H. La corteza cerebral más allá de la corteza. Colombiana Psiquiatría. 2004; 33(1):58-75.

(62) Tirapu-Ustárroz J, García-Molina A, Luna-Lario P, Verdejo-García A, Ríos-Lago M. Corteza prefrontal, funciones ejecutivas y regulación de la conducta. En: Neuropsicología de la corteza prefrontal y las funciones ejecutivas. Barcelona: Viguera; 2012. p. 87-120.

(63) Ismail FY, Fatemi A, Johnston MV. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. Eur J Paediatr Neurol. 2017; 21(1):23-48. doi: 10.1016/j.ejpn.2016.07.007.

(64) Reidler JS, Zaghi S, Fregni F. Chapter 12 - Neurophysiological Effects of Transcranial Direct Current Stimulation. En: Neurofeedback and Neuromodulation Techniques and Applications. San Diego: Academic Press; 2011. p. 319-349.

(65) Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M. Polarization of the human motor cortex through the scalp. NeuroReport. 1998; 9(10):2257–2260.

(66) Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. J Physiol (Lond). 2000; 527(3):633-639. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00633.x.

(67) Ugawa Y. Motor cortical plasticity in basal ganglia disorders or movement disorders. Basal Ganglia. 2012; 2(3):119-121. doi: 10.1016/j.baga.2012.08.005.

(68) Iyer MB, Mattu U, Grafman J, Lomarev M, Sato S, Wassermann EM. Safety and cognitive effect of frontal DC brain polarization in healthy individuals. Neurology. 2005; 64(5):872-875. doi: 10.1212/01.WNL.0000152986.07469.E9.

(69) Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. Brain Stimul. 2012; 5(3):175-195. doi: 10.1016/j.brs.2011.03.002.

(70) Monte-Silva K, Kuo M, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA. Shaping the optimal repetition interval for cathodal transcranial direct current stimulation (tDCS). J Neurophysiol. 2010; 103(4):1735-1740. doi: 10.1152/jn.00924.2009.

(71) Nitsche MA, Liebetanz D, Antal A, Lang N, Tergau F, Paulus W. Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation-technical, safety and functional aspects. Suppl Clin Neurophysiol. 2003; 56:255-276. doi: 10.1016/s1567-424x(09)70230-2.

(72) Ragert P, Vandermeeren Y, Camus M, Cohen LG. Improvement of spatial tactile acuity by transcranial direct current stimulation. Clin Neurophysiol. 2008; 119(4):805-811. doi: 10.1016/j.clinph.2007.12.001.

(73) Boggio PS, Bermpohl F, Vergara AO, Muniz, Ana L. C. R., Nahas FH, Leme PB, et al. Go-no-go task performance improvement after anodal transcranial DC stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in major depression. J Affect Disord. 2007; 101:91-98. doi: 10.1016/j.jad.2006.10.026.

(74) Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. Clin Neurophysiol. 2003; 114(4):600-604. doi: 10.1016/s1388-2457(02)00412-1.

(75) Utz KS, Dimova V, Oppenländer K, Kerkhoff G. Electrified minds: transcranial direct current stimulation (tDCS) and galvanic vestibular stimulation (GVS) as methods of non-invasive brain stimulation in neuropsychology--a review of current data and future implications. Neuropsychologia. 2010; 48(10):2789-2810. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2010.06.002.

(76) Novo-Olivas C, Gutiérrez L, Bribiesca J. Mapeo Electroencefalográfico y Neurofeedback. En: Aproximaciones al estudio de la neurociencia del comportamiento. Mexico: Springer; 2010. p. 371-412.

(77) Wagner T, Fregni F, Fecteau S, Grodzinsky A, Zahn M, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation: A computer-based human model study. NeuroImage. 2007; 35(3):1113-1124. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.01.027.

(78) Brunoni AR, Amadera J, Berbel B, Volz MS, Rizzerio BG, Fregni F. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. Int J Neuropsychopharmacol. 2011; 14(8):1133-1145. doi: 10.1017/S1461145710001690.

(79) Matsumoto H, Ugawa Y. Adverse events of tDCS and tACS: A review. Clin Neurophysiol Pract. 2017; 2:19-25. doi: 10.1016/j.cnp.2016.12.003.

(80) Alway SE, Siu PM, Murlasits Z, Butler DC. Muscle hypertrophy models: applications for research on aging. Can J Appl Physiol. 2005; 30(5):591-624.

(81) Ambrosio F, Fitzgerald GK, Ferrari R, Distefano G, Carvell G. A murine model of muscle training by neuromuscular electrical stimulation. J Vis Exp. 2012; 63:e3914. doi: 10.3791/3914.

(82) Distefano G, Ferrari RJ, Weiss C, Deasy BM, Boninger ML, Fitzgerald GK, et al. Neuromuscular electrical stimulation as a method to maximize the beneficial effects of muscle stem cells transplanted into dystrophic skeletal muscle. PLoS ONE. 2013; 8(3):e54922. doi: 10.1371/journal.pone.0054922.

(83) Lovering RM, Roche JA, Goodall MH, Clark BB, McMillan A. An in vivo Rodent Model of Contraction-induced Injury and Non-invasive Monitoring of Recovery. J Vis Exp. 2011; 51:e2782. doi: 10.3791/2782.

(84) Hakim CH, Wasala NB, Duan D. Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle ex vivo and tibialis anterior muscle in situ in mice. J Vis Exp. 2013; 72:e50183. doi: 10.3791/50183.

(85) Lynch GS, Carlson G, Barton E, Wells D. Measuring isometric force of isolated mouse skeletal muscles in situ. Treat-NMD Neuromuscular Network. 2009; 1:1-9.

(86) Valenzuela P, de M, Torrella J, de l. The effect of high-frequency neuromuscular electrical stimulation training on skeletal muscle properties in mice. Archives of Biological Sciences. 2017; 69(3):391-397. doi: 10.2298/ABS160925110V.

(87) Meng H, Janssen PML, Grange RW, Yang L, Beggs AH, Swanson LC, et al. Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. J Vis Exp. 2014; 89:e51586. doi: 10.3791/51586.

(88) Kano Y, Shimegi S, Furukawa H, Matsudo H, Mizuta T. Effects of aging on capillary number and luminal size in rat soleus and plantaris muscles. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002; 57(12):422. doi: 10.1093/gerona/57.12.b422.

(89) Ballak SB, Jaspers RT, Deldicque L, Chalil S, Peters EL, de Haan A, et al. Blunted hypertrophic response in old mouse muscle is associated with a lower satellite cell density and is not alleviated by resveratrol. Experimental Gerontology. 2015; 62:23-31. doi: 10.1016/j.exger.2014.12.020.

(90) Fouces V, Torrella JR, Palomeque J, Viscor G. A histochemical ATPase method for the demonstration of the muscle capillary network. J Histochem Cytochem. 1993; 41(2):283-289. doi: 10.1177/41.2.7678272.

(91) Rosenblatt JD, Kuzon WM, Plyley MJ, Pynn BR, McKee NH. A histochemical method for the simultaneous demonstration of capillaries and fiber type in skeletal muscle. Stain Technol. 1987; 62(2):85-92. doi: 10.3109/10520298709107973.

(92) Zhou Y, Liu D, Kaminski HJ. Myosin heavy chain expression in mouse extraocular muscle: more complex than expected. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51(12):6355-6363. doi: 10.1167/iovs.10-5937.

(93) Forns-Escudé N, Villa P. [dir]. Estudio conductual y estructural del sistema visual de ratón RD10. Evaluación del efecto neuroprotector de la proinsulina [Tesis Doctoral]. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; 2008.

(94) Gondin J, Giannesini B, Vilmen C, Dalmasso C, le Fur Y, Cozzone PJ, et al. Effects of stimulation frequency and pulse duration on fatigue and metabolic cost during a single bout of neuromuscular electrical stimulation. Muscle Nerve. 2010; 41(5):667-678. doi: 10.1002/mus.21572.

(95) Olson, Bradley J. S. C., Markwell J. Assays for determination of protein concentration. Curr Protoc Protein Sci. 2007; 48:3.4.1–3.4.29. doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48.

(96) Colaboradores Wikipedia. Detalles bibliográficos de Western Blot. 2019. Available at: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Western_blot&oldid=121167399. Accessed Nov 12, 2020.

(97) Sedgmond J, Lawrence NS, Verbruggen F, Morrison S, Chambers CD, Adams RC. Prefrontal brain stimulation during food-related inhibition training: effects on food craving, food consumption and inhibitory control. R Soc Open Sci. 2019; 6(1):181-186. doi: 10.1098/rsos.181186.

(98) Gandiga PC, Hummel FC, Cohen LG. Transcranial DC stimulation (tDCS): a tool for double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. Clin Neurophysiol. 2006; 117(4):845-850. doi: 10.1016/j.clinph.2005.12.003.

(99) Colaboradores de Bipolar Network News. 30 Minutes of TDCS Better Than 20 Minutes in Patients with Unipolar Depression. 2018. Available at: http://bipolarnews.org/?p=4498. Accessed Nov 12, 2020.

(100) DaSilva AF, Volz MS, Bikson M, Fregni F. Electrode positioning and montage in transcranial direct current stimulation. J Vis Exp. 2011; 51:e2744. doi: 10.3791/2744.

(101) Blundell J, De-Graaf K, Finlayson G, Halford G, Hetherington M, King N, et al. Measuring food intake, hunger, satiety and satiation in the laboratory. En: Handbook of Assessment Methods for Eating Behaviours and Weight-Related Problems: Measures, Theory and Research. United Kingdom: Sage Publications; 2009. p. 283-326.

(102) Moreno S, Rodríguez S, Fernandez MC, Tamez J, Cepeda-Benito A. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. Assessment. 2008; 15(3):375-387. doi: 10.1177/1073191107312651.

(103) Cepeda-Benito A, Fernandez MC, Moreno S. Relationship of gender and eating disorder symptoms to reported cravings for food: construct validation of state and trait craving questionnaires in Spanish. Appetite. 2003; 40(1):47-54. doi: 10.1016/s0195-6663(02)00145-9.

(104) Cepeda-Benito A, Gleaves DH, Fernández MC, Vila J, Williams TL, Reynoso J. The development and validation of Spanish versions of the State and Trait Food Cravings Questionnaires. Behav Res Ther. 2000; 38(11):1125-1138. doi: 10.1016/s0005-7967(99)00141-2.

(105) Cepeda-Benito A, Gleaves DH, Williams TL, Erath SA. The development and validation of the state and trait food-cravings questionnaires. Behavior Therapy. 2000; 31(1):151-173. doi: 10.1016/S0005-7894(00)80009-X.

(106) Jáuregui-Lobera I, García-Cruz P, Carbonero-Carreño R, Magallares A, Ruiz-Prieto I. Psychometric properties of Spanish version of the Three-Factor Eating Questionnaire-R18 (Tfeq-Sp) and its relationship with some eating- and body image-related variables. Nutrients. 2014; 6(12):5619-5635. doi: 10.3390/nu6125619.

(107) López-Aguilar X, Mancilla-Díaz JM, Vázquez-Arévalo R, Franco-Paredes K, Alvarez-Rayón GL, Ocampo Téllez-Girón MT. Propiedades psicométricas del Cuestionario de Tres Factores de la Alimentación (TFEQ). Revista Mexicana de Trastornos Alimentarios. 2011; 2(1):24-32.

(108) Batterink L, Yokum S, Stice E. Body mass correlates inversely with inhibitory control in response to food among adolescent girls: an fMRI study. Neuroimage. 2010; 52(4):1696-1703. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.05.059.

(109) Blechert J, Meule A, Busch NA, Ohla K. Food-pics: an image database for experimental research on eating and appetite. Front Psychol. 2014; 5:617. doi: 10.3389/fpsyg.2014.00617.

(110) Marron EM, Viejo-Sobera R, Cuatrecasas G, Redolar-Ripoll D, Lorda PG, Datta A, et al. Prefronto-cerebellar neuromodulation affects appetite in obesity. International Journal of Obesity. 2019; 43(10):2119-2124. doi: 10.1038/s41366-018-0278-8.

(111) Val-Laillet D, Aarts E, Weber B, Ferrari M, Quaresima V, Stoeckel LE, et al. Neuroimaging and neuromodulation approaches to study eating behavior and prevent and treat eating disorders and obesity. Neuroimage Clin. 2015; 8:1-31. doi: 10.1016/j.nicl.2015.03.016.

(112) Vainik U, Dagher A, Dubé L, Fellows LK. Neurobehavioural correlates of body mass index and eating behaviours in adults: a systematic review. Neurosci Biobehav Rev. 2013; 37(3):279-299. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.11.008.

(113) Vainik U, Baker TE, Dadar M, Zeighami Y, Michaud A, Zhang Y, et al. Neurobehavioral correlates of obesity are largely heritable. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018; 115(37):9312-9317. doi: 10.1073/pnas.1718206115.

(114) Ziauddeen H, Alonso-Alonso M, Hill JO, Kelley M, Khan NA. Obesity and the Neurocognitive Basis of Food Reward and the Control of Intake12. Adv Nutr. 2015; 6(4):474-486. doi: 10.3945/an.115.008268.

(115) Ogasawara R, Kobayashi K, Tsutaki A, Lee K, Abe T, Fujita S, et al. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. J Appl Physiol. 2013; 114(7):934-940. doi: 10.1152/japplphysiol.01161.2012.

(116) Tsutaki A, Ogasawara R, Kobayashi K, Lee K, Kouzaki K, Nakazato K. Effect of intermittent low-frequency electrical stimulation on the rat gastrocnemius muscle. Biomed Res Int. 2013; 2013:480620. doi: 10.1155/2013/480620.

(117) Durigan J, Cancelliero KM, Guirro R, Silva CA, Polacow M. Effects of neuromuscular electric stimulation on rats' soleus muscle: a morphometric and metabolic analysis. Acta Ortop Bras. 2008; 16(4):238-241. doi: 10.1590/S1413-78522008000400010.

(118) Di Filippo ES, Mancinelli R, Marrone M, Doria C, Verratti V, Toniolo L, et al. Neuromuscular electrical stimulation improves skeletal muscle regeneration through satellite cell fusion with myofibers in healthy elderly subjects. J Appl Physiol. 2017; 123(3):501-512. doi: 10.1152/japplphysiol.00855.2016.

(119) Wong TS, Booth FW. Protein metabolism in rat gastrocnemius muscle after stimulated chronic concentric exercise. J Appl Physiol. 1990; 69(5):1709-1717. doi: 10.1152/jappl.1990.69.5.1709.

(120) Hawley JA. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible?. Appl Physiol Nutr Metab. 2009; 34(3):355-361. doi: 10.1139/H09-023.

(121) Baar K. Using Molecular Biology to Maximize Concurrent Training. Sports Med. 2014; 44(Suppl 2):117-125. doi: 10.1007/s40279-014-0252-0.

(122) Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nature Cell Biology. 2001; 3(11):1014-1019. doi: 10.1038/ncb1101-1014.

(123) Goodman CA, Frey JW, Mabrey DM, Jacobs BL, Lincoln HC, You J, et al. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. J Physiol (Lond). 2011; 589:5485-5501. doi: 10.1113/jphysiol.2011.218255.

(124) Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. Am J Physiol. 1999; 276:120. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.1.C120.

(125) Stepto NK, Coffey VG, Carey AL, Ponnampalam AP, Canny BJ, Powell D, et al. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. Med Sci Sports Exerc. 2009; 41(3):546-565. doi: 10.1249/MSS.0b013e31818c6be9.

(126) Banerjee P, Caulfield B, Crowe L, Clark A. Prolonged electrical muscle stimulation exercise improves strength and aerobic capacity in healthy sedentary adults. J Appl Physiol. 2005; 99(6):2307-2311. doi: 10.1152/japplphysiol.00891.2004.

(127) Enoka RM. Neural adaptations with chronic physical activity. J Biomech. 1997; 30(5):447-455. doi: 10.1016/s0021-9290(96)00170-4.

(128) Gabriel DA, Kamen G, Frost G. Neural adaptations to resistive exercise: mechanisms and recommendations for training practices. Sports Med. 2006; 36(2):133-149. doi: 10.2165/00007256-200636020-00004.

(129) Bickel CS, Gregory CM, Dean JC. Motor unit recruitment during neuromuscular electrical stimulation: a critical appraisal. Eur J Appl Physiol. 2011; 111(10):2399-2407. doi: 10.1007/s00421-011-2128-4.

(130) Dreibati B, Lavet C, Pinti A, Poumarat G. Influence of electrical stimulation frequency on skeletal muscle force and fatigue. Ann Phys Rehabil Med. 2010; 53(4):266-277. doi: 10.1016/j.rehab.2010.03.004.

(131) Kesar T, Binder-Macleod S. Effect of frequency and pulse duration on human muscle fatigue during repetitive electrical stimulation. Exp Physiol. 2006; 91(6):967-976. doi: 10.1113/expphysiol.2006.033886.

(132) Lou JWH, Bergquist AJ, Aldayel A, Czitron J, Collins DF. Interleaved neuromuscular electrical stimulation reduces muscle fatigue. Muscle Nerve. 2017; 55(2):179-189. doi: 10.1002/mus.25224.

(133) Vromans M, Faghri PD. Functional electrical stimulation-induced muscular fatigue: Effect of fiber composition and stimulation frequency on rate of fatigue development. J Electromyogr Kinesiol. 2018; 38:67-72. doi: 10.1016/j.jelekin.2017.11.006.

(134) Clemente FR, Matulionis DH, Barron KW, Currier DP. Effect of motor neuromuscular electrical stimulation on microvascular perfusion of stimulated rat skeletal muscle. Phys Ther. 1991; 71(5):397-406. doi: 10.1093/ptj/71.5.397.

(135) Clement DL, Shepherd JT. Influence of Muscle Afferents on Cutaneous and Muscle Vessels in the Dog. Circulation Research. 1974; 35(2):177-183.

(136) Bergquist AJ, Clair JM, Lagerquist O, Mang CS, Okuma Y, Collins DF. Neuromuscular electrical stimulation: implications of the electrically evoked sensory volley. Eur J Appl Physiol. 2011; 111(10):2409-2426. doi: 10.1007/s00421-011-2087-9.

(137) Caiozzo VJ, Baker MJ, Baldwin KM. Modulation of myosin isoform expression by mechanical loading: role of stimulation frequency. J Appl Physiol. 1997; 82(1):211-218. doi: 10.1152/jappl.1997.82.1.211.

(138) Minetto MA, Botter A, Bottinelli O, Miotti D, Bottinelli R, D'Antona G. Variability in muscle adaptation to electrical stimulation. Int J Sports Med. 2013; 34(6):544-553. doi: 10.1055/s-0032-1321799.

(139) Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Metter EJ, et al. Skeletal muscle satellite cell characteristics in young and older men and women after heavy resistance strength training. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2001; 56(6):240. doi: 10.1093/gerona/56.6.b240.

(140) Darr KC, Schultz E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. J Appl Physiol. 1987; 63(5):1816-1821. doi: 10.1152/jappl.1987.63.5.1816.

(141) Crameri RM, Weston A, Climstein M, Davis GM, Sutton JR. Effects of electrical stimulation-induced leg training on skeletal muscle adaptability in spinal cord injury. Scand J Med Sci Sports. 2002; 12(5):316-322.

(142) Mackey AL, Brandstetter S, Schjerling P, Bojsen-Moller J, Qvortrup K, Pedersen MM, et al. Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. FASEB J. 2011; 25(6):1943-1959. doi: 10.1096/fj.10-176487.

(143) Crameri RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J, Kjær M. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. J Physiol. 2007; 583(1):365-380. doi: 10.1113/jphysiol.2007.128827.

(144) Martínez RM, Osta R. [dir]. Caracterización de las células madre satélite musculares en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica [Tesis Doctoral]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2011.

(145) Grau AG, Guerra B, Calbet JA. Papel de la células satélite en la hipertrofia y regeneración muscular en respuesta al ejercicio. Archivos de Medicina del Deporte. 2007; 14(119):187-196.

(146) Liu J, Höglund A, Karlsson P, Lindblad J, Qaisar R, Aare S, et al. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle fibres from mammals representing a 100,000-fold difference in body size. Exp Physiol. 2009; 94(1):117-129. doi: 10.1113/expphysiol.2008.043877.

(147) Van der Meer, S. F. T., Jaspers RT, Degens H. Is the myonuclear domain size fixed?. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2011; 11(4):286-297.

(148) Brack A, Bildsoe H, Hughes S. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. Journal of cell science. 2005; 118:4813-4821. doi: 10.1242/jcs.02602.

(149) Bruusgaard JC, Liestøl K, Gundersen K. Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. J Appl Physiol. 2006; 100(6):2024-2030. doi: 10.1152/japplphysiol.00913.2005.

(150) O'Connor RS, Pavlath GK. Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. J Appl Physiol. 2007; 103(3):1099-1100. doi: 10.1152/japplphysiol.00101.2007.

(151) Lewis SE, Kelly FJ, Goldspink DF. Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat. Biochem J. 1984; 217(2):517-526. doi: 10.1042/bj2170517.

(152) Mantilla CB, Sieck GC. In response to Point:Counterpoint: "Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy". J Appl Physiol. 2007; 103(3):1104. doi: 10.1152/japplphysiol.00466.2007.

(153) Crognale D, Vito GD, Grosset J, Crowe L, Minogue C, Caulfield B. Neuromuscular electrical stimulation can elicit aerobic exercise response without undue discomfort in healthy physically active adults. J Strength Cond Res. 2013; 27(1):208-215. doi: 10.1519/JSC.0b013e318252f5e5.

(154) Crowe L, Caulfield B. Pushing out the limits of electrical stimulation. A case study in the aggressive use of an alternative to voluntary exercise. BMJ Case Rep. 2011 doi: 10.1136/bcr.06.2011.4343.

(155) Vinogradova OL, Popov DV, Tarasova oS, Bravyĭ IR, Missina SS, Bersenev EI, et al. Ergoreflex: the essence and mechanisms. Aviakosm Ekolog Med. 2008; 42(1):5-15.

(156) Gluck ME, Alonso-Alonso M, Piaggi P, Weise CM, Jumpertz-von Schwartzenberg R, Reinhardt M, et al. Noninvasive neuromodulation targeted to the lateral prefrontal cortex induces changes in energy intake and weight loss in obesity. Obesity (Silver Spring). 2015; 23(11):2149-2156. doi: 10.1002/oby.21313.

(157) Heinitz S, Reinhardt M, Piaggi P, Weise CM, Diaz E, Stinson EJ, et al. Neuromodulation directed at the prefrontal cortex of subjects with obesity reduces snack food intake and hunger in a randomized trial. Am J Clin Nutr. 2017; 106(6):1347-1357. doi: 10.3945/ajcn.117.158089.

(158) Fassini PG, Das SK, Suen VMM, Magerowski G, Alonso-Alonso M. Prefrontal tDCS effects on appetite may depend on dopamine status: preliminary analysis of a clinical trial. Brain Stimul. 2019; 12(2): doi: 10.1016/j.brs.2018.12.768.

(159) Lapenta OM, Sierve KD, de Macedo EC, Fregni F, Boggio PS. Transcranial direct current stimulation modulates ERP-indexed inhibitory control and reduces food consumption. Appetite. 2014; 83:42-48. doi: 10.1016/j.appet.2014.08.005.

(160) Fregni F, Orsati F, Pedrosa W, Fecteau S, Tome FAM, Nitsche MA, et al. Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates the desire for specific foods. Appetite. 2008; 51(1):34-41. doi: 10.1016/j.appet.2007.09.016.

(161) Goldman RL, Borckardt JJ, Frohman HA, O'Neil PM, Madan A, Campbell LK, et al. Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) temporarily reduces food cravings and increases the self-reported ability to resist food in adults with frequent food craving. Appetite. 2011; 56(3):741-746. doi: 10.1016/j.appet.2011.02.013.

(162) Kekic M, McClelland J, Campbell I, Nestler S, Rubia K, David AS, et al. The effects of prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) on food craving and temporal discounting in women with frequent food cravings. Appetite. 2014; 78:55-62. doi: 10.1016/j.appet.2014.03.010.

(163) Ljubisavljevic M, Maxood K, Bjekic J, Oommen J, Nagelkerke N. Long-Term Effects of Repeated Prefrontal Cortex Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) on Food Craving in Normal and Overweight Young Adults. Brain Stimul. 2016; 9(6):826-833. doi: 10.1016/j.brs.2016.07.002.

(164) Truong DQ, Magerowski G, Blackburn GL, Bikson M, Alonso-Alonso M. Computational modeling of transcranial direct current stimulation (tDCS) in obesity: Impact of head fat and dose guidelines. Neuroimage Clin. 2013; 2:759-766. doi: 10.1016/j.nicl.2013.05.011.

(165) Bonilla DA. Inervación del Músculo Esquelético y Tipos de Fibras Musculares. 2014. Available at: https://g-se.com/inervacion-del-musculo-esqueletico-bp-P57cfb26d6dd48. Accessed Ene 24, 2020.

ANEXOS

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA FORMACIÓN DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

ARTÍCULO 1º

Immediate effects of thoracic spinal mobilisation on erector spinae muscle activity and pain in patients with thoracic spine pain: a preliminary randomised controlled trial

ARTÍCULO 2º

The effect of high frequency neuromuscular electrical stimulation training on skeletal muscle properties in mice

ARTÍCULO 3º

Hyperphosphatemia Promotes Senescence of Myoblasts by Impairing Autophagy Through Ilk Overexpression, A Possible Mechanism Involved in Sarcopenia

ARTÍCULO 4º

Neuromodulation of the prefrontal cortex facilitates diet-induced weight loss in midlife women: a randomized, proof-of-concept clinical trial

ANEXO II

CUESTIONARIOS

CUESTIONARIO DE ANSIEDAD POR LA COMIDA FCQ-T

Versión Española del Food Craving Questionnaire-Trait (FCQ-T) [1].

Código del participante: **Fecha:**

INSTRUCCIONES: Hemos escrito una lista de comentarios que la gente ha hecho acerca de sentimientos, pensamientos, deseos, tentaciones, y antojos relacionados con la comida y el comer. Por favor, utilizando los números que hay debajo de cada descripción (1 a 6), tache con una "X" el número de la izquierda indicando la frecuencia con la que usted se siente así, o hasta qué punto cada comentario describe cómo usted piensa o se siente en general.

Como para sentirme mejor.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Algunas veces, mi vida parece perfecta cuando como lo que me apetece.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando como lo que deseo me siento mejor.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Comer lo que me apetece mucho me sienta estupendamente.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Comer me alivia.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando como lo que deseo me siento menos deprimido.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

El comer me tranquiliza.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

Después de comer no tengo tantas ansiedades.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Sin duda alguna, las ganas de comer me hacen pensar en cómo voy a conseguir lo que quiero comer.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cada vez que deseo comer algo en particular me pongo a hacer planes para comer

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando se me antoja una comida, normalmente intento comerla tan pronto como pueda.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando estoy con alguien que está comiendo me entra hambre.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cada vez que voy a un banquete termino comiendo más de lo que necesito.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Para mi es difícil resistir la tentación de tomar comidas apetecibles que están a mi alcance.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando estoy con alguien que se pasa comiendo, yo también me paso.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

No hago más que pensar en la comida.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

A veces me encuentro pensativo preocupado con comida.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Por mucho que lo intento, no puedo parar de pensar en comer.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

Gasto demasiado tiempo pensando en lo próximo que voy a comer.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

A veces me doy cuenta de que estoy soñando despierto y estoy soñando en comer.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cada vez que se me antoja una comida sigo pensando en comer hasta que como lo que se me antojó.

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando tengo muchas ganas de comer algo estoy obsesionado con comer lo que deseo

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Se me hace la boca agua cuando pienso en mis comidas favoritas

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Siento deseos intensos de comer cuando mi estómago está vacío

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Siento como que mi cuerpo me pidiera ciertas comidas

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Me entra tanta hambre que mi estomago se siente como un pozo sin fondo

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando tengo deseos intensos de comer, una vez que me pongo a comer no puedo parar de comer

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

A veces, cuando como lo que se me antoja, pierdo control y como demasiado

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Si tengo la comida que deseo, no puedo resistir la tentación de comerla

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

No tengo la fuerza de voluntad de resistir mis deseos de comer las comidas que se me antojan

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Una vez que me pongo a comer tengo problemas en dejar de comer

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Si me dejo llevar por la tentación de comer pierdo todo mi control

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Siento deseos de comer cuando estoy aburrido(a), enfadado(a), o triste

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

A menudo deseo comer cuando siento emociones fuertes

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando estoy muy estresado me entran deseos fuertes de comer

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Me entran deseos fuertes de comer cuando estoy disgustado(a)

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

Detesto no poder resistir la tentación de comer

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

A menudo me siento culpable cuando deseo ciertas comidas

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

Cuando como algo que deseo con intensidad me siento culpable

(1) Nunca; (2) Raramente; (3) Algunas veces; (4) A menudo; (5) Casi siempre; (6) Siempre

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

CUESTIONARIO DE ANSIEDAD POR LA COMIDA FCQ-S

Versión Española del Food Craving Questionnaire-State (FCQ-S) [1].

Código del participante: **Fecha:**

INSTRUCCIONES: Hemos escrito una lista de comentarios que la gente ha hecho acerca de sentimientos, pensamientos, deseos, tentaciones y antojos relacionados con la comida y el comer. Por favor, utilizando los números que hay debajo de cada descripción (1 a 5), tache con una "X" el número de la izquierda indicando hasta qué punto usted está de acuerdo si se siente así ahora mismo. Por favor tenga en cuenta que algunas preguntas se refieren a una o varias comidas en particular (comidas que le apetecerían ahora), mientras que otras se refieren a comidas que le apetecen en general.

Ahora mismo, tengo un deseo intenso de comer una o varias comidas en particular.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Ahora mismo tengo un antojo por una o varias comidas en particular.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Ahora mismo me urge comer una o varias comidas en particular.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Si pudiera comer una o varias comidas en particular me sentiría perfectamente.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

Estoy seguro(a) de que si comiera lo que deseo, mi humor mejoraría.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Comer una o varias comidas en particular me haría sentir maravillosamente.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Si comiera algo no me sentiría tan débil y aletargado(a).

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Me sentiría menos antipático(a) e irritable si pudiera satisfacer mis deseos de comer.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Me sentiría más alerta si pudiera satisfacer mis deseos de comer.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Si tomara una o varias comidas en particular no podría parar de comerlas.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

Mi deseo de comer una o varias comidas en particular puede más que yo.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Ahora mismo, sé que voy a seguir pensando en lo que me apetece hasta que lo consiga.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Tengo hambre.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Si pudiera comer algo ahora mismo, mi estómago no se sentiría tan vacío.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

Me siento débil por no comer.

(1) Absolutamente nada de acuerdo
(2) Casi nada de acuerdo
(3) Neutral
(4) Un poco de acuerdo
(5) Muy de acuerdo

[1] Moreno S, et al. Clinical validation of the trait and state versions of the Food Craving Questionnaire. *Assessment* 2008 Sep;15(3):375-87. doi: 10.1177/1073191107312651.

CUESTIONARIO TFEQ – HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN

CUESTIONARIO DE CONDUCTA ALIMENTARIA TFEQ-SP-R18

Versión Española del The Three Factor Eating Questionnaire (TFEQ-SP-R18) [1].

Código del participante: **Fecha:**

INSTRUCCIONES: por favor, responde a cada una de las siguientes preguntas macando una "X" en la respuesta que se adapte mejor a tu caso para cada una de las frases.

1) **Cuando huelo una comida deliciosa me resulta muy difícil no probarla, incluso si acabo de terminar mi comida.**
   - ☐ *Completamente cierto*
   - ☐ *Cierto en general*
   - ☐ *Falso en general*
   - ☐ *Completamente falso*

2) **Deliberadamente tomo pequeñas cantidades de comida como medio para controlar mi peso.**
   - ☐ *Completamente cierto*
   - ☐ *Cierto en general*
   - ☐ *Falso en general*
   - ☐ *Completamente falso*

3) **Cuando me siento ansioso/a (nervioso/a) sin darme cuenta me encuentro comiendo.**
   - ☐ *Completamente cierto*
   - ☐ *Cierto en general*
   - ☐ *Falso en general*
   - ☐ *Completamente falso*

4) **A veces cuando empiezo a comer parece que no puedo parar.**
   - ☐ *Completamente cierto*
   - ☐ *Cierto en general*
   - ☐ *Falso en general*
   - ☐ *Completamente falso*

[1] Jauregui-Lobera I, et al. Psychometric Properties of Spanish Version of the Three-Factor Eating Questionnaire-R18 (Tfeq-Sp) and Its Relationship with Some Eating- and Body Image-Related Variables. *Nutrients* 2014, 6, 5619-5635; doi:10.3390/nu6125619.

5) Estar con alguien mientras come me hace sentir hambre como para ponerme a comer también.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

6) Cuando me siento mal [depresivo(a), infeliz] suelo comer demasiado.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

7) Cuando veo algo muy exquisito me entra tanta hambre que tengo que comerlo en ese mismo momento.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

8) Me siento tan hambriento/a que mi estómago a menudo parece un pozo sin fondo.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

9) Siempre tengo hambre, de modo que para mí es difícil parar de comer hasta que acabo la comida del plato.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

10) Cuando me siento solo/a me consuelo comiendo.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

11) Me controlo conscientemente en las comidas para no ganar peso.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

12) No suelo comer algunos alimentos porque me hacen engordar.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

13) Siempre siento tanta hambre como para poder comer en cualquier momento.

- ☐ *Completamente cierto*
- ☐ *Cierto en general*
- ☐ *Falso en general*
- ☐ *Completamente falso*

14) ¿Con qué frecuencia te sientes hambriento/a?

- ☐ *Solamente a la hora de comer*
- ☐ *A veces entre comidas*
- ☐ *A menudo entre comidas*
- ☐ *Casi siempre*

15) ¿Con qué frecuencia evitas almacenar alimentos muy tentadores o apetecibles?

- ☐ *Casi nunca*
- ☐ *Alguna vez*
- ☐ *Con frecuencia*
- ☐ *Casi siempre*

16) ¿Con qué probabilidad comes conscientemente menos de lo que quieres?

- ☐ *Improbable*
- ☐ *Ligeramente probable*
- ☐ *Moderadamente probable*
- ☐ *Altamente probable*

17) Continúas comiendo excesivamente aunque no tengas hambre?

- ☐ *Nunca*
- ☐ *Rara vez*
- ☐ *A veces*
- ☐ *Al menos una vez a la semana*

18) En una escala de 1 a 8, donde 1 significa no restringir la ingesta y 8 significa restricción total, ¿con qué número te valorarías a ti mismo/a?

Escribe aquí el número____

Firma del investigador