



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Métodos no supervisados para estimar las entradas neuronales netas a los músculos a partir de registros de electromiografía

Unsupervised methods for estimating net neural inputs to muscles from electromyography recordings

Autor

María Sarasquete Martínez

Director/es

Jaime Ibáñez Pereda

Luis Enrique Montano Gella

Máster Universitario en Ingeniería Biomédica

Escuela de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de Zaragoza
Curso 2022-2023



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
de Ingeniería de Aragón
Universidad Zaragoza



Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón

Índice

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. CONTROL NEUROMUSCULAR.....	7
2.2. EMG: GENERACIÓN, REGISTRO Y DESCOMPOSICIÓN.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la transmisión descendente de las ondas beta.....	5
Figura 2. Esquema explicativo del principio de sumación temporal.....	8
Figura 3. Ilustración esquemática del principio de sumación espacial.....	8
Figura 4. Representación de electrodos de EMG bipolar	10
Figura 5. Representación de matriz de electrodos de HD-EMG	10
Figura 6. Esquema generación y descomposición EMG.	11
Figura 7. Representación de la trayectoria objetivo de la fuerza	13
Figura 8. Ejemplificación de las señales tras el preprocesamiento	13
Figura 9. Representación gráfica de los criterios de selección de MUs.	14
Figura 10. Ejemplificación de la señal EEG canal Cz y derivación laplaciana.....	15
Figura 11. Representación de los <i>tapers</i> utilizados en el cálculo de la coherencia....	16
Figura 12. Representación ejemplo de señal EMG previo y posterior al cálculo de la rectificación	17
Figura 13. Representación de la composición de trenes de picos.....	17
Figura 14. Ejemplo ajuste exponencial en datos de coherencia en función del número de MUs reclutadas.....	18
Figura 15. Esquema del cálculo de la estimación bipolar a partir de la matriz de HD-EMG	18
Figura 16. Ejemplo de la optimización de la coherencia en función del número de iteraciones.....	19
Figura 17. Esquema de la transformación de la señal por optimización de la proyección de los canales	20
Figura 18. Ejemplificación de las señales acotadas a las ráfagas de activación en beta.	21
Figura 19. Representación de la progresión de la coherencia en función del grupo de MUs considerado	24
Figura 20. Diagrama de caja comparativo de diferentes tratamientos de la señal de HD-EMG.....	25
Figura 20. Diagrama de caja comparativo de diferentes tratamientos de la señal de HD-EMG completa y restringida a la activación en la banda beta.....	26

Índice de tablas

Tabla 1. MUs detectadas y conservadas por sujeto y bloque.23

Tabla 2. MUs representativas y descompuestas por sujeto y bloque.24

Índice de anexos

Anexo 1. Código principal para el cálculo de la coherencia

Anexo 2. Variación de la coherencia en función de los parámetros de tolerancia utilizados en la optimización.

Anexo 3. Representaciones espaciales sobre la matriz de electromiografía

Anexo 4. Tablas de resultados de análisis estadísticos.

Anexo 5. Representaciones de la evolución de la coherencia en función de las unidades motoras reclutadas

Anexo 6. Comparativa progresión de la coherencia con el número de motoneuronas y coherencia estimada de la optimización de la proyección del electromiograma de alta densidad

1. Resumen

Todos los movimientos que realizamos se basan en la contracción muscular, por ello, es de interés el estudio de la transmisión de señales entre el cerebro (coordinador de los movimientos voluntarios) y el músculo. Sin embargo, se desconoce el contenido de la información que se transmite para generar la contracción muscular y tampoco conocemos cuáles son las transformaciones que las señales cerebrales sufren en su transmisión a los músculos. Una posible vía para avanzar en esta línea de estudio son las ondas beta (15 - 30 Hz) que se transmiten linealmente durante contracciones musculares sostenidas. Su análisis se puede realizar estimando la coherencia corticomuscular entre las señales de electroencefalografía y electromiografía. Los estudios de la banda beta se han centrado habitualmente en el análisis de los registros bipolares (señal diferencial de dos electrodos). No obstante, este registro tiene importantes limitaciones que se pueden reducir con la utilización de registros de electromiografía de alta densidad (con una matriz de electrodos) o la descomposición de la señal de electromiografía en los pulsos de actividad de las neuronas motoras.

En este estudio se llevó a cabo el análisis comparativo entre la medida de coherencia corticomuscular utilizando la señal descompuesta de actividad de las neuronas motoras y la misma utilizando una combinación óptima de los canales de la señal de electromiografía de alta densidad. Además, se realizó una estimación del registro bipolar como referencia, y se aplicaron transformaciones adicionales para comprobar su efecto sobre la coherencia: rectificación y corte de las señales en intervalos de mayor actividad en beta.

Los resultados obtenidos muestran que con la metodología aplicada es posible estudiar la propagación de ritmos beta al conjunto de neuronas motoras, denotando el muestreo de la señal que llevan a cabo las neuronas motoras y una posible distribución uniforme de las entradas que estas reciben. También se destacan las limitaciones de los registros y métodos utilizados actualmente y se aporta una perspectiva de posible mejora. Por último, se postula que la ineficiencia del corte de las señales en intervalos de actividad en beta puede deberse a que la señal no se transmite en intervalos como describen otros autores, o, a que los intervalos de no actividad no afectan a la medida de la coherencia. En general, este trabajo ofrece una nueva vía de investigación sobre la transmisión corticomuscular.

2. Introducción

La contracción muscular desempeña un papel fundamental en nuestras actividades diarias, permitiéndonos realizar una variedad de movimientos desde desplazarnos hasta realizar acciones específicas como masticar o enfocar nuestra mirada. Este proceso complejo implica la colaboración de varias estructuras en nuestro cuerpo, incluyendo el cerebro y la médula espinal, encargados del control, así como los músculos responsables de la ejecución ^{1,2}. Sin embargo, aún tenemos un conocimiento limitado sobre cómo se transmite la información entre nuestro sistema nervioso central y los músculos.

El estudio de la transmisión de información neuromuscular es crucial para avanzar en el conocimiento del sistema nervioso y el control motor ^{3,4}, mejorar el diagnóstico y tratamiento de trastornos neuromusculares, y promover el desarrollo de nuevas neurotecnologías ^{5,6} que permitan progresar en el diseño de nuevos conceptos de interfaces neuronales ^{7,8}.

Con el fin de avanzar en el conocimiento sobre la transmisión corticomuscular, es importante profundizar en la comprensión de sus características. La dificultad en este caso es que no existen evidencias claras sobre los contenidos de información neuronal que el cerebro envía a la médula espinal y los músculos para determinar nuestros movimientos voluntarios. Una posible alternativa consiste en utilizar otra información para la cual existan evidencias de transmisión entre el cerebro y los músculos. Éste es el caso de las ondas beta (patrones de actividad eléctrica cerebral que se encuentran en un rango de frecuencia específico, generalmente entre 15 y 30 Hz) las cuales se ha observado que se transmiten de manera lineal entre la corteza motora y los músculos durante contracciones musculares sostenidas ⁹⁻¹¹. Por lo tanto, el estudio de estas ondas y su transmisión puede servirnos para obtener información valiosa sobre las características de la transmisión corticomuscular.

Las ondas beta son detectables a nivel cortical mediante electroencefalografía (EEG) y se han visto asociadas a diferentes estados de funcionamiento del cerebro como la percepción y la atención. También se ha observado que las ondas beta están relacionadas con la planificación y ejecución de movimientos voluntarios, especialmente en áreas motoras del cerebro ^{11,12}. No obstante, en la actualidad se desconocen las funciones y origen de este tipo de actividad cerebral. Estas oscilaciones se transmiten desde el cerebro a los músculos a través del tracto corticoespinal, que es la vía neuronal más directa que conecta al cerebro con la médula espinal y los músculos ^{13,14}. Como consecuencia de dicha transmisión descendente de ondas beta, las neuronas motoras (esto es, las neuronas que conectan al sistema nervioso con los músculos y controlan las contracciones producidas por estos) tienden a mostrar actividad coherente con los ritmos beta corticales ^{15,16} (Fig. 1). Este hecho, apreciable en los registros de electromiografía (EMG), se puede observar a partir del estudio de la coherencia espectral entre las señales registradas en la corteza motora y en los músculos (a este tipo de medida se le denomina coherencia corticomuscular, o simplemente CMC) ^{10,11,17}. Cabe destacar, que en estudios recientes se ha postulado que la actividad en beta no se transmite de forma continua, sino en segmentos temporales de activación, "ráfagas" ^{11,18}. Esto en el futuro podría suponer un cambio de paradigma en el tratamiento de las señales para el estudio de la CMC.

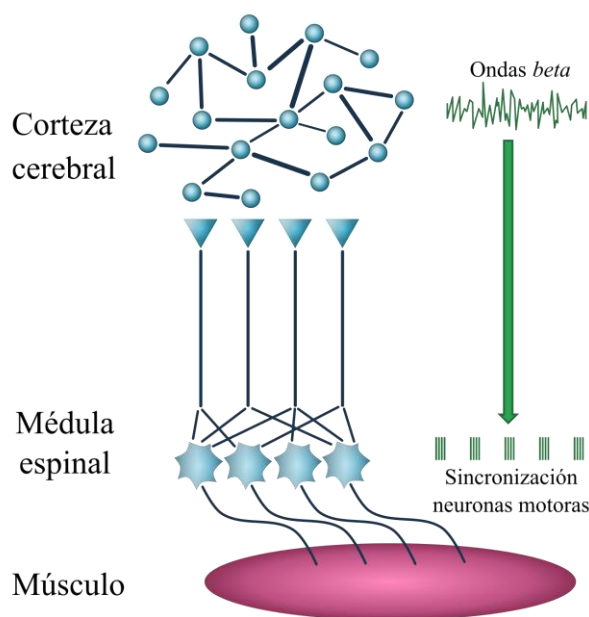


Figura 1. Esquema de la transmisión descendente de las ondas beta. En azul se reflejan las células nerviosas del tracto corticoespinal, en rosa las fibras musculares y en verde las ondas transmitidas.

La CMC es una medida ampliamente utilizada y valiosa para investigar la transmisión lineal de actividad rítmica entre la corteza cerebral y la actividad eléctrica producida por los músculos durante el periodo de contracción muscular. Esta medida se basa en el análisis de la correlación entre las señales cerebrales y musculares. Es una herramienta importante para comprender los procesos neuromusculares y los mecanismos subyacentes al control motor en el cerebro ^{14,19}, y de hecho es una herramienta que ha sido ampliamente utilizada para estudiar distintos estados neuronales asociados con actividad motora, y también para caracterizar distintos tipos de trastornos del movimiento y discapacidades motoras debidas a trastornos neurológicos ²⁰⁻²².

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones sobre CMC en la banda beta se han centrado en analizar la actividad de EMG utilizando derivaciones bipolares ²³⁻²⁵. Sin embargo, esta forma de registro presenta dos limitaciones importantes. En primer lugar, solo se captura la señal desde un punto específico del músculo, lo que impide obtener registros óptimos y una visión completa de la actividad del músculo estudiado (y, por lo tanto, de la actividad neuronal transmitida al músculo) ²⁶. En segundo lugar, el espectro de potencia de la señal de EMG está dominado por la forma de onda que se genera cuando un potencial de acción neuronal se transforma en un potencial muscular que viaja a lo largo de las fibras musculares ^{27,28}.

Una posible solución al primero de los dos problemas anteriormente citados es el uso de registros de alta densidad muscular (HD-EMG, por sus siglas en inglés). En este caso, lo que se hace es registrar la actividad de una serie de puntos en el músculo de tal manera que puedan ser medidas las contribuciones de distintas unidades motoras (unidad motora o MU, por sus siglas en inglés, engloba una neurona motora y las fibras musculares a las que inerva). Se debe tener en cuenta la necesidad de convertir esa actividad de alta densidad en una señal única con la que estimar la CMC. Lo cual podría resolverse mediante la utilización de métodos de optimización de la combinación del espacio de canales de registro.

Concretamente, en literatura se han llevado a cabo compensaciones del retardo desconocido entre la corteza motora y la actividad muscular ²⁹; optimizaciones entre los espacios multivariados de EEG y HD-EMG ³⁰; y combinaciones de ambos ³¹.

La limitación en el uso de señales de EMG dada por el efecto de la forma de onda del potencial de acción muscular se debe a que el músculo actúa a modo de filtro paso bajo sobre los potenciales de acción neuronales que se transmiten a los músculos. Para resolverla se puede hacer uso de técnicas de descomposición de la actividad de las neuronas motoras que inervan los músculos a partir de registros musculares ³²⁻³⁴. Estos métodos son de gran utilidad porque permiten modelar la evolución de la CMC en función del número de MUs y, de esta forma, generar estimaciones de la coherencia máxima de la transmisión de proyecciones corticales a los músculos. No obstante, las técnicas de descomposición de actividad de neuronas motoras también tienen limitaciones en términos de la cantidad y el tipo de neuronas que pueden ser descompuestas, especialmente en experimentos en humanos. En general, dependiendo del sujeto y del músculo estudiado, se pueden descomponer de manera fiable un rango de 5 a 30 MUs con los métodos actuales ³³. Esto implica que no se puede obtener una visión completa de todas las neuronas motoras presentes en el músculo que se está estudiando. Además, la descomposición depende de propiedades anatómicas y no de información neuronal. Es decir, únicamente se pueden detectar y descomponer aquellas MUs que se encuentren más cercanas a la superficie de registro y sean de mayor tamaño, debido a las restricciones de los algoritmos de descomposición. En consecuencia, la información obtenida de la actividad de neuronas motoras descompuestas será parcial y no representará la totalidad de la actividad transmitida por las neuronas motoras activas en un músculo ^{33,35}.

Hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios que comparen las estimaciones de la CMC a partir de distintos tipos de actividad muscular tales como los registros de EMG y las señales de activación de neuronas motoras obtenidas a partir de la descomposición de registros superficiales. Este tipo de comparación puede ser de utilidad para estimar el número de neuronas motoras aproximado que es necesario para poder caracterizar de manera fiable la transmisión de actividad oscilatoria a los músculos, y para profundizar en el estudio de las propiedades de la transmisión de actividad cerebral a poblaciones de neuronas motoras que inervan un músculo determinado.

Este estudio tiene como objetivo realizar, por primera vez, una comparación entre distintas formas de analizar la CMC a partir de actividad de EMG con distintas configuraciones, o a partir de actividad de neuronas motoras descompuestas. Esto permitirá responder a dos preguntas fundamentales. En primer lugar, se pretende estimar el porcentaje de unidades motoras que contribuyen a los registros de EMG y que se pueden descomponer con las actuales herramientas de descomposición de actividad neuronal. En segundo lugar, la comparación entre la CMC obtenida a partir de la actividad de neuronas motoras y la calculada a partir de la señal de HD-EMG permitirá determinar las características de la proyección de la actividad beta al conjunto de neuronas motoras que inervan el músculo registrado. Además, se considera la posible mejora de los actuales métodos de registro y tratamiento de la señal, aplicando la rectificación o la definición de segmentos de activación en beta.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Instituto Universitario de Investigación de Ingeniería en Aragón (I3A), en la línea de interfaces neuronales del grupo de Interpretación de Señales Biomédicas y Simulación Computacional (BSICoS).

El documento está organizado en diferentes secciones que brindan información sobre el proceso de investigación y los resultados obtenidos. Antes de entrar en los detalles de los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, la discusión de los hallazgos y las conclusiones del estudio, se presenta un marco teórico sobre las técnicas empleadas en este estudio y sobre el modo de transmisión de actividad neuronal del cerebro a los músculos. Específicamente, se explican los conceptos y principios esenciales relacionados con el control de los músculos por parte del sistema nervioso, cómo se generan las señales eléctricas en los músculos, cómo se registran esas señales y cómo se descomponen para analizar la actividad de las MUs individuales. Esta sección proporciona una base sólida de conocimiento para comprender los aspectos técnicos y científicos del estudio.

2.1. Control neuromuscular

El sistema de control motor se divide en una serie de áreas que controlan diferentes aspectos del movimiento. Estas se encuentran en todo el sistema nervioso y están organizadas de manera jerárquica. La jerarquía consta principalmente de cuatro niveles: la médula espinal, el tronco encefálico, la corteza motora y la corteza de asociación ^{1,2}.

La médula espinal y el tronco encefálico es donde se localizan las neuronas motoras (o motoneuronas) inferiores, también denominadas alfa, que inervan el músculo, y donde muchas interneuronas y circuitos neuronales complejos llevan a cabo los principios básicos del control motor. Los tipos de movimientos controlados por estos circuitos no se inician conscientemente (actos reflejos o automatismos rítmicos). Por otra parte, las áreas de la corteza cerebral planifican acciones voluntarias, coordinan secuencias de movimientos, toman decisiones sobre estrategias conductuales y transmiten comandos a los conjuntos apropiados de neuronas motoras inferiores para ejecutar las acciones deseadas ^{1,2}.

Cada motoneurona alfa inerva un subconjunto de fibras musculares en un músculo, formando una unidad motora (MU). Cada fibra muscular está inervada por una única motoneurona. Los músculos encargados de mover nuestras extremidades y tronco están controlados por cientos o miles de MUs (el número varía en función del músculo). La conexión entre una neurona motora y las fibras que inerva tiene una propiedad relevante para la transmisión de impulsos nerviosos a los músculos: por cada potencial de acción que viaja por la neurona motora se genera un potencial de acción en las fibras musculares que da lugar al acortamiento de las fibras y a la contracción del músculo ^{1,16,36}. De esta forma los tiempos de la descarga de la MU reflejan el patrón de descarga correspondiente de la motoneurona y el análisis de los potenciales de acción de las unidades motoras (MUAPs, por sus siglas en inglés, en singular, MUAP) proporciona una ventana al estudio de entradas neuronales al músculo ³⁷.

Las neuronas motoras de la médula espinal reciben miles de entradas sinápticas excitatorias e inhibitorias. Si la entrada sináptica neta supera el umbral de despolarización de una motoneurona se produce un potencial de acción en la misma. La transformación de la entrada sináptica llevada a cabo por cada neurona es un proceso no lineal ^{36,38}. Sin embargo, algunas de las entradas sinápticas se comparten entre las motoneuronas y generan descargas más sincrónicas, ya que sus potenciales de membrana comparten fluctuaciones comunes. Las secuencias resultantes de potenciales de acción corresponden a los resultados de varios procesos de muestreo cuyas densidades de pulsos siguen las

fluctuaciones de amplitud de la entrada compartida ¹⁵. De manera que el conjunto de neuronas motoras linealiza la relación entre su entrada sináptica común y el impulso neural al músculo ^{14,16}.

En cuanto al control de la fuerza muscular, se produce mediante dos principios: sumación temporal y sumación espacial. El primero depende de la frecuencia de potenciales de acción generados por las neuronas motoras, de manera que, la tasa de disparos estará asociada con el nivel de contracción de las fibras musculares ^{1,15} (Fig. 2). Mientras que, el segundo consiste en el reclutamiento de unidades motoras. Con una señal de entrada de intensidad creciente, comienzan reclutándose las MUs más pequeñas y, a continuación, según la intensidad de esa señal de entrada crece, se activarán cada vez más MUs, y en especial, MUs más grandes ^{1,15} (Fig. 3).

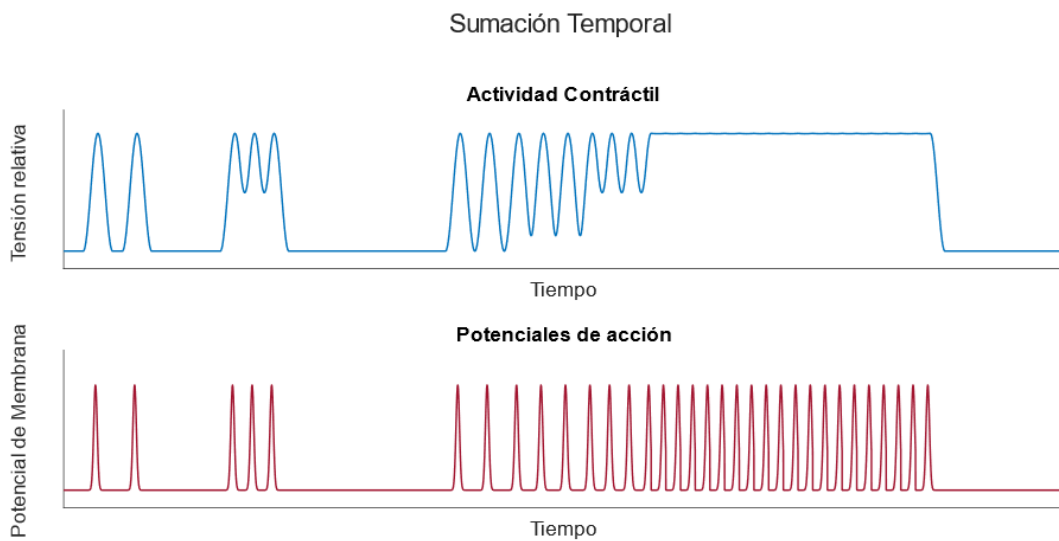


Figura 2. Esquema explicativo del principio de sumación temporal en el control de la fuerza muscular.

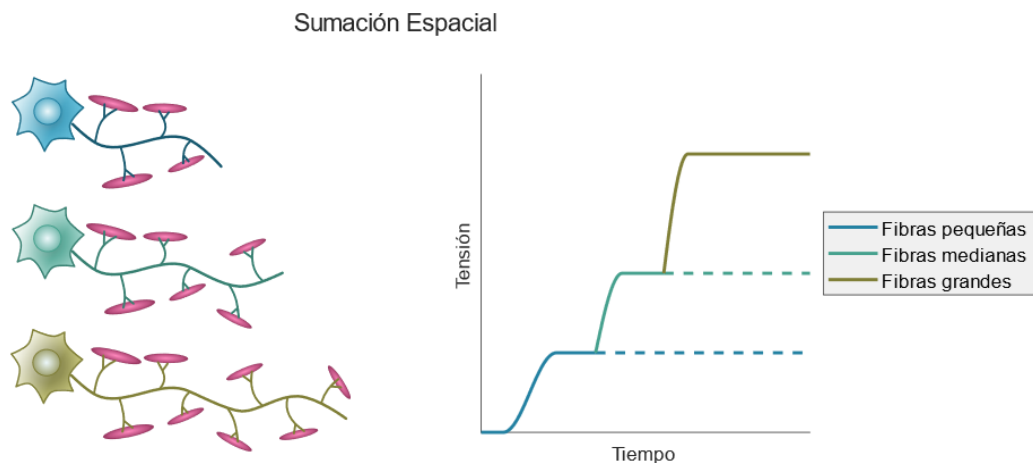


Figura 3. Ilustración esquemática del principio de sumación espacial en el control de la fuerza muscular.

2.2. EMG: generación, registro y descomposición

Como se ha descrito, la contracción muscular está precedida por una cascada de eventos electrofisiológicos, que, en cierto modo contribuyen a la generación y propagación del potencial eléctrico dando lugar al electromiograma (EMG).

El EMG es una señal compleja que se puede modelar como el resultado de sumar los trenes de potenciales de acción muscular de distintas MUs activas en las proximidades del electrodo de registro más ruido eléctrico (Fig. 6 Izqda.). De esta forma, la actividad producida por cada MU se traduce como la convolución de un tren de impulsos y la forma del potencial de acción, diferente para cada una ^{39,40}. Las características del potencial dependerán del diámetro de las fibras inervadas, la velocidad de conducción del potencial de acción a través de las fibras, la ubicación del punto de conexión entre la neurona motora y las fibras (placa motora), la ubicación del electrodo de registro de EMG respecto al músculo, y la configuración del registro ⁴¹.

Existen dos tipos de registros de EMG: intramuscular y de superficie, registradas con electrodos invasivos y no invasivos, respectivamente. La EMG intramuscular utiliza agujas que penetran en el músculo, y tiene la ventaja de ser adecuada para detectar la actividad de MUs individuales y minimizar el *crossstalk* (señal procedente de un músculo cercano, que puede dar lugar a interpretaciones incorrectas). Sin embargo, es altamente invasivo y solo mide actividad muy localizada del músculo (lo que permite tener acceso a una o pocas MUs). Por contra, en la EMG de superficie se colocan los electrodos sobre la superficie de la piel, por lo que es seguro y fácil de realizar. Además, este tipo de registros permite medir actividad de un área más grande del músculo. En cambio, la EMG superficial tiene importantes limitaciones como el *crossstalk* y la complejidad para medir actividad en músculos profundos ^{32,42}. Además, el efecto del conductor de volumen (los tejidos) que separa las fibras musculares de los electrodos de detección es un proceso de difusión que resulta en un filtro de paso bajo cuya selectividad depende de la distancia entre electrodos y fuentes ³².

Los registros estándar en EMG de superficie son registros bipolares en los que se colocan dos electrodos sobre el músculo y mediante un amplificador diferencial se atenúan en gran medida los componentes comunes de los registros de dichos electrodos (Fig. 4). De manera que, las señales bipolares minimizan el ruido circundante, sin embargo, eliminan también señales de MUs profundas (que se reflejan en ambos canales) ⁴³. Recientemente, el desarrollo de la electromiografía de alta densidad, mediante la utilización de una matriz de electrodos referidos a un electrodo externo al músculo, ha permitido superar algunas de estas limitaciones (Fig. 5). El registro continuo de múltiples canales permite un análisis de la señal en el dominio temporal y espacial, abriendo nuevas posibilidades a la investigación del sistema neuromuscular ^{26,32}.

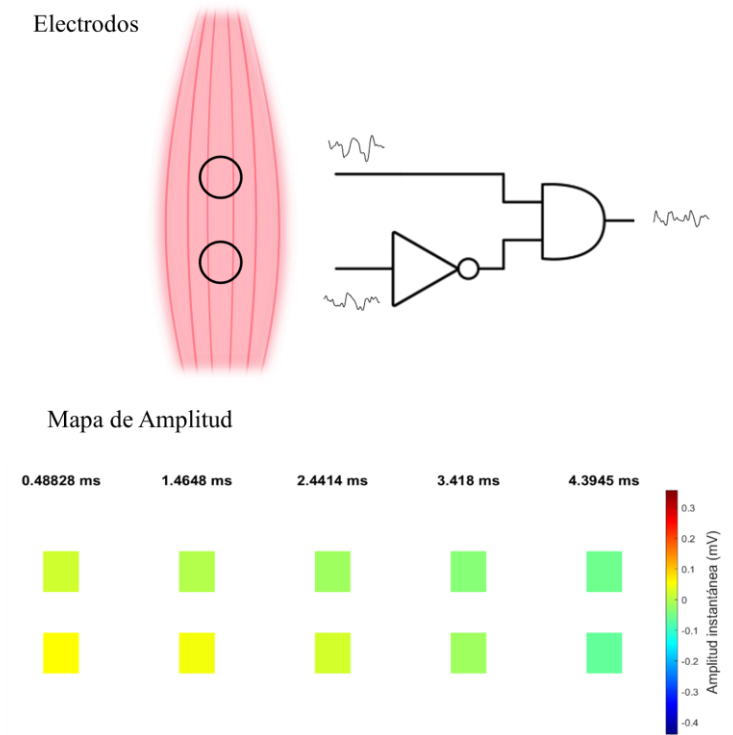


Figura 4. Representación de electrodos de EMG bipolar: colocación sobre el músculo, señales resultantes y mapas de amplitud en el tiempo.

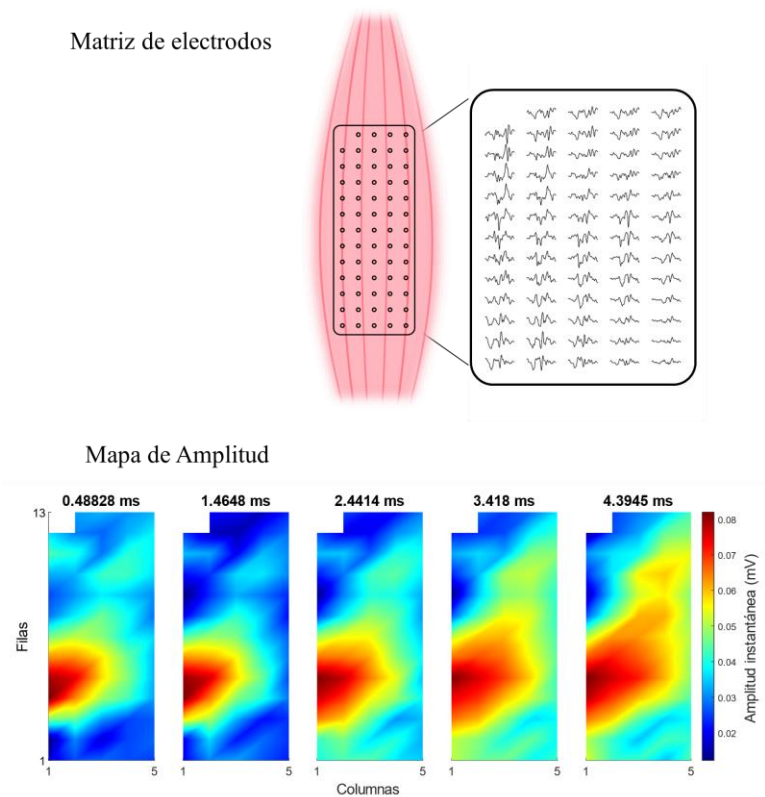


Figura 5. Representación de matriz de electrodos de HD-EMG: colocación sobre el músculo, señales resultantes y mapas de amplitud en el tiempo.

Teóricamente, una señal EMG se compone de contribuciones de todas las fibras activas en el músculo. Sin embargo, debido a la separación radial entre las fibras musculares distantes y la superficie de detección del electrodo, la amplitud y el contenido de alta frecuencia de las contribuciones de los MUAPs de fibras distantes pueden atenuarse por debajo del nivel del ruido de fondo. A niveles tan bajos, estos MUAPs, por sí mismos, no pueden ser discriminados del ruido. No obstante, se puede reconocer la superposición de pequeñas contribuciones de los MUAPs con muchas otras contribuciones similares y coherentes. En consecuencia, en las señales detectadas con distintos electrodos, las ocurrencias aisladas de los MUAPs y las contribuciones de fibras individuales a los MUAPs pueden detectarse y, por lo tanto, es posible descomponer estas señales ^{33,41} (Fig. 6 Dcha.).

La descomposición de la señal EMG es el proceso de resolver una señal EMG compuesta en sus MUAPs constituyentes. Los dos supuestos básicos con respecto a la capacidad de descomponer una señal EMG son que todos los potenciales de las MUs que contribuyen significativamente a la señal compuesta pueden detectarse y que cada MUAP detectado puede asociarse correctamente con la MU que lo creó. Para reconocer los diferentes potenciales, es necesario que los MUAPs generados por la misma MU tengan una forma similar entre sí, a diferencia de los generados por MUs diferentes. Además, se requiere que los MUAPs de cada MU se presenten en cantidad suficiente y sin superposición de otros potenciales ^{32,41}.

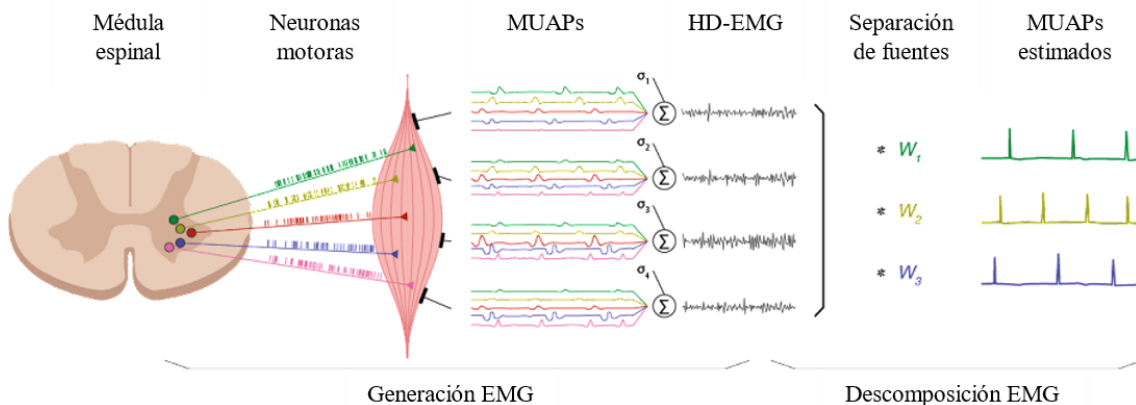


Figura 6. Esquema generación y descomposición EMG. Se ilustra la imagen en dos regiones: la de la izquierda muestra el modelo de generación de la señal de EMG, mientras que la de la derecha muestra el modelo de descomposición en MUAPs.

3. Materiales y métodos

Los experimentos con los que se obtuvieron los datos para la realización de este estudio consistieron en registrar de manera simultánea actividad electroencefalográfica (EEG) y actividad electromiográfica de alta densidad (HD-EMG) del tibial anterior mientras los sujetos realizan una tarea de contracción isométrica sostenida del músculo. Los experimentos se realizaron para un estudio anterior¹³ y se reutilizan en este estudio. A continuación, se describen las características de los datos y el protocolo de adquisición. Posteriormente se presentan los métodos y análisis empleados en este estudio.

Participantes

Seis sujetos sanos fueron reclutados, sus edades estaban comprendidas entre 24 y 35 años. Todos ellos dieron su consentimiento informado antes de participar en el estudio, aprobado por el Comité de Ética del University College London (Solicitud de Ética 10037/001) y realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Adquisición de datos

Se registraron datos de fuerza, HD-EMG y EEG.

Para la adquisición de datos de HD-EMG se utilizó un amplificador multicanal (Quattrocento, OT Bioelettronica, Italia) y una matriz de electrodos de 5 columnas y 13 filas con 1 mm de diámetro y 8 mm de distancia entre electrodos. La frecuencia de muestreo fue 2048 Hz. El mismo sistema también registró la fuerza medida por un sensor colocado en una estructura rígida que inmovilizaba el pie de los sujetos experimentales de tal manera que éstos pudiesen generar fuerzas contra el sensor mediante la flexión del tobillo. El EEG se registró con un amplificador de 63 canales (ActiChamp, BrainProducts, Alemania); en este caso se utilizó una frecuencia de muestreo de 1000 Hz. Con la finalidad de sincronizar los registros de los dos tipos de información se utilizó una señal digital que presentaba transiciones entre 0 y 5 V en determinados instantes de tiempo para marcar el inicio y el final de los intervalos de registro. Esta señal fue adquirida por los dos sistemas de medida y se utilizó en el análisis a posteriori de los datos para alinear los registros musculares y corticales.

Protocolo experimental

Tras colocar todos los electrodos, los sujetos se posicionaron sentados con las piernas formando un ángulo recto y el pie derecho bajo una palanca medidora de fuerza. Primero se familiarizaron con la tarea y, a continuación, realizaron dos ejecuciones con un descanso de 2 min entre ellas. Las instrucciones fueron mantener la fuerza lo más estable posible siguiendo las referencias proporcionadas e impedir la compensación de músculos próximos. Esta compensación se refiere a la activación de músculos vecinos para ayudar a la ejecución del movimiento o la estabilización de la articulación. Se pidió a los sujetos que siguieran trayectorias de fuerza representadas en un monitor (Fig. 7 Superior) que, a su vez, mostraba a tiempo real la fuerza ejercida (Fig. 7 Inferior). Las trayectorias consistían en una rampa de 2 s en la que aumentaban la fuerza desde un 0% hasta un 10% de la contracción voluntaria máxima (MVC, por sus siglas en inglés), seguida de una retención de 60 s, manteniendo una fuerza isométrica del 10% de MVC, y un tramo final de rampa descendente desde el 10% de MVC hasta el 0% en 2 s.

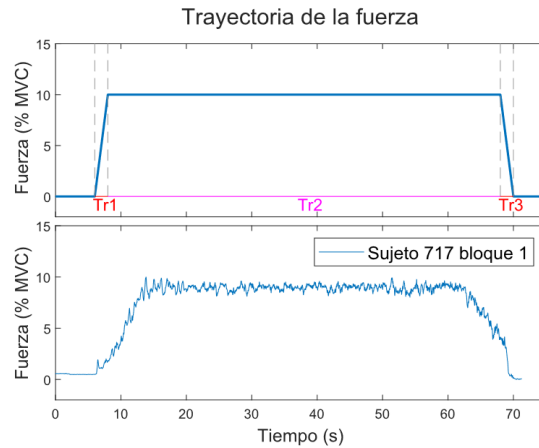


Figura 7. Superior: representación de la trayectoria objetivo de la fuerza durante la actividad experimental. En esta se representan los tres trayectos a seguir como Tr1 (ascendente), Tr2 (constante) y Tr3 (descendente). Inferior: ejemplificación de trayectoria real, llevada a cabo por el sujeto 717 en la primera repetición.

Se han proporcionado al alumno dos archivos de datos de MATLAB (.mat) por cada paciente y repetición (bloque), uno que contiene los datos del registro de EEG y otro con los datos de HD-EMG y fuerza. Este último contiene, además, una matriz con la descomposición de la señal de HD-EMG en MUAPs.

Preprocesamiento

Las señales se interpolaron para obtener la misma frecuencia de muestreo en ambas, posibilitando transformaciones y análisis en conjunto. A continuación, a las señales se les aplicó un filtro paso banda de Butterworth de cuarto orden y retraso cero (banda de paso de 20 a 400 Hz para el HD-EMG y de 0.5 a 100 Hz para el EEG). También se aplicó un filtro Notch de 50 Hz a cada señal para eliminar el ruido producido por la corriente eléctrica. Finalmente, las señales se alinearon a partir de la señal digital registrada por los amplificadores de señal de HD-EMG y EEG tal y como se ha descrito anteriormente. Las señales resultantes se muestran en la Figura 8.

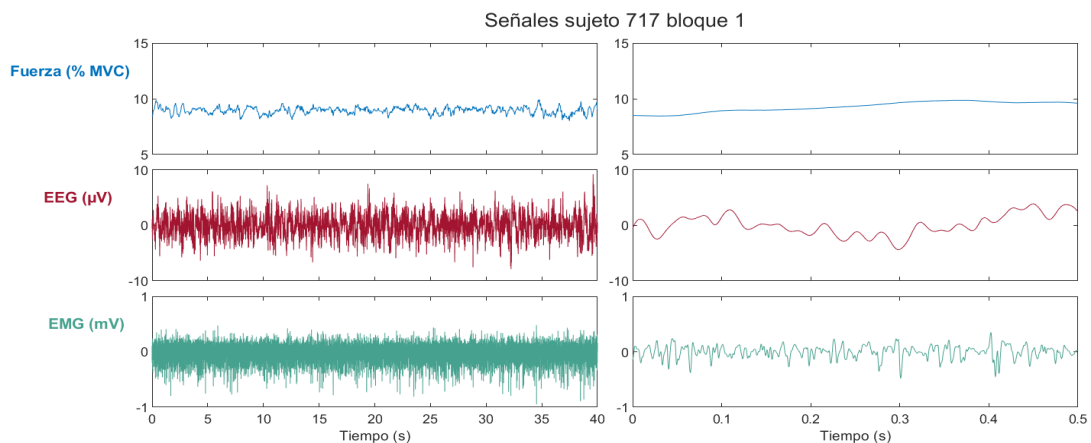


Figura 8. Ejemplificación de las señales tras el preprocesamiento, del sujeto 717 durante la primera repetición. Se muestra de arriba a abajo las señales de fuerza, EEG y EMG. A la izquierda se muestra el tiempo total considerado, y a la derecha un segmento temporal de 500 ms.

La descomposición de los registros de HD-EMG en MUs se realizó utilizando técnicas de separación ciega de fuentes. En este caso se utilizó un método basado en el algoritmo de análisis de componentes independientes (ICA) para separar de manera ciega mezclas convolutivas. Este algoritmo ha sido validado en estudios anteriores ³⁷. A modo resumido, este método de estimación de unidades motoras asume que las señales mezcladas son una combinación lineal de componentes independientes. Así, utilizando diferentes técnicas de optimización busca matrices de descomposición que al ser multiplicadas por los registros multicanal de EMG, produzca unas señales que maximicen la ‘escasez’ (del inglés *sparseness*) de las fuentes estimadas. Esto implica utilizar métodos que minimicen la cantidad de valores significativos en los componentes estimados, ya que esta dispersión es indicativa de componentes independientes. La salida de esta descomposición fue manualmente analizada para garantizar que únicamente se considerasen MUs descompuestas de manera fiable ⁴⁴.

A partir de los resultados de descomposición, se seleccionaron aquellas MUs que cumplieran los siguientes criterios: primer potencial de acción en los primeros 5 s del intervalo de interés analizado y último potencial en los últimos 5 s (Fig. 9 Superior); espacios sin potenciales de acción detectados menores de 1 s (Fig. 9 Centro); y tasa de disparo promedio entre 8 y 15 potenciales por segundo (Fig. 9 Inferior). Estos criterios de fiabilidad tienen como objetivo que las señales analizadas sean consistentes y representativas de la actividad muscular, de esta forma aseguran la estabilidad de la información en el intervalo.

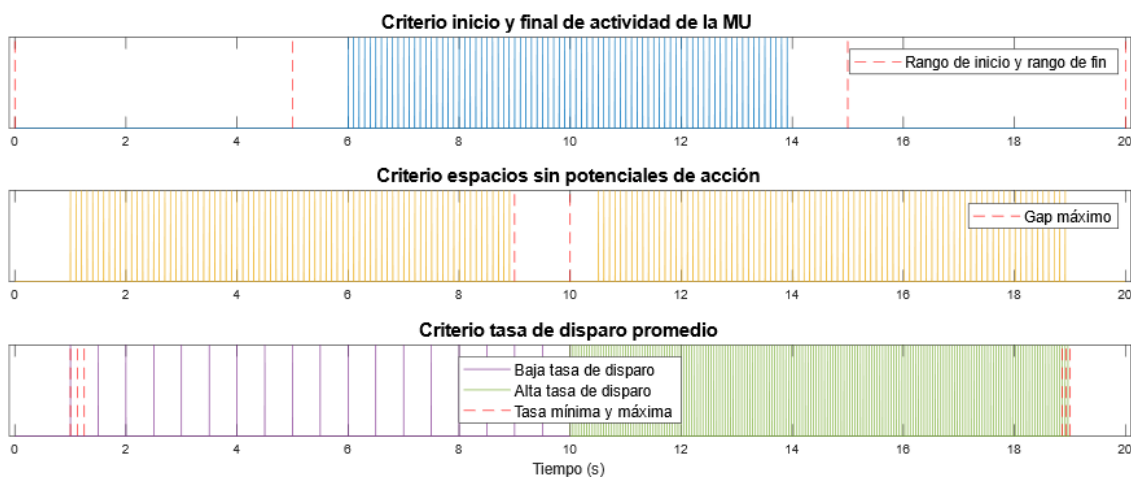


Figura 9. Representación gráfica de los criterios de selección de MUs. Se representan los MUAPs como deltas de Dirac en distintos colores según el caso; y con líneas rojas discontinuas los límites establecidos en cada criterio.

Dado que para el análisis a llevar a cabo en este estudio se necesitan registros estables de actividad muscular, se escogió un intervalo de tiempo de 40 s durante el periodo de contracción isométrica al 10% de la máxima fuerza generable. El intervalo se determinó escogiendo el periodo de 40 s en el que se obtuviera un mayor número de MUs extraídas que cumplan los criterios de fiabilidad descritos anteriormente.

En cuanto a la matriz de electrodos del EEG, el canal con el que se ha trabajado es “Cz”, ya que es el más cercano a la región central de la corteza motora que cuenta con proyecciones neuronales al músculo estudiado. Para aumentar la resolución espacial de la medida de actividad cortical, se calculó la derivación laplaciana del registro de Cz utilizando como referencias los registros en los canales adyacentes (FCz, C1, C2, CPz) obteniendo una información más local de la región de interés ⁶⁴. Este tipo de transformación consiste en calcular la diferencia entre el registro en el canal Cz y el promedio de los registros en los canales adyacentes. En la Figura 10 se muestra el registro Cz de uno de los sujetos (Superior) y el resultado de la derivación laplaciana (Inferior).

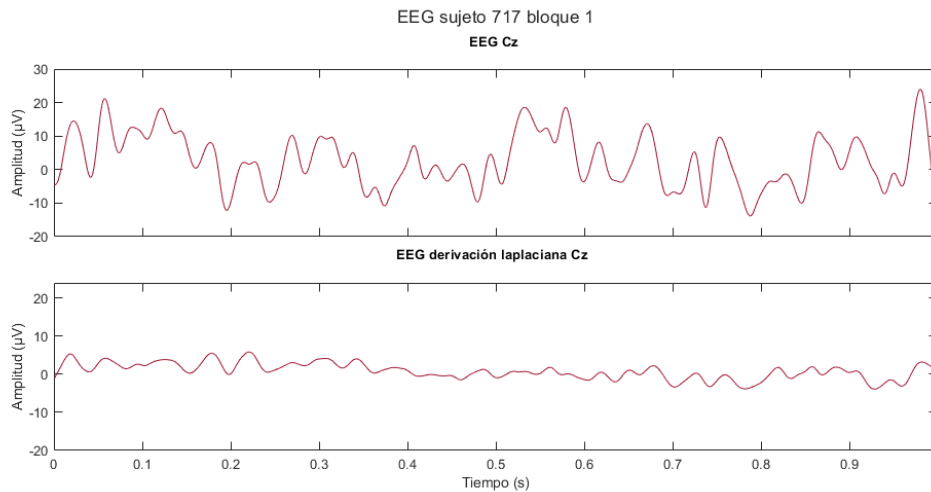


Figura 10. Ejemplificación de la señal EEG: en la parte superior el canal Cz previo cálculo de la derivación laplaciana y en la parte inferior, la derivación laplaciana del canal Cz. Representados resultados del sujeto 717 en la primera repetición. La señal se muestra acotada a 1 s de duración.

Análisis de los datos

Se calculó la coherencia entre la señal de EEG y distintas versiones de la señal de HD-EMG: registro bipolar, proyección óptima y actividad de MUs. Se aplica además la rectificación para la mejora de componentes a bajas frecuencias que son filtrados por el músculo. Y, finalmente, se lleva a cabo extracción de eventos de activación en la banda de frecuencias beta, ya que se ha observado recientemente que la actividad beta cortical aparece en segmentos temporales de corta duración (ráfagas) y se espera que acotando la señal a estos segmentos de mayor transmisión en beta se obtenga una mayor CMC en esta banda de frecuencias. En el Anexo 1 se proporciona el código principal del cálculo de coherencias.

Para el cálculo de la CMC, tradicionalmente se utilizan métodos de estimación espectral y espectro cruzado. Estos métodos no permiten separar las contribuciones a la medida de CMC de las transmisiones en dirección descendente (de corteza al músculo) y ascendente (del músculo a la corteza). En este caso, interesa estimar la coherencia en la dirección de transmisión del cerebro al músculo. Para llevar a cabo esta medida direccional, se utiliza un método no paramétrico que se adecúa a las características de la señal de las MUs (que es una señal de tipo proceso de puntos, que contiene eventos discretos en el tiempo) ⁴⁵. De forma resumida, este método aplica una transformación lineal de las señales estudiadas para blanquear su espectro de potencia, es decir, se aplican filtros diseñados para que la distribución de frecuencias se asemeje a una distribución uniforme. De esta

forma, es posible asumir que los autoespectros son blancos y la CMC se reduce al espectro cruzado. Esto permite que la medida de CMC se pueda separar en las componentes debidas a la transmisión en las direcciones: positiva (en este caso, la transmisión de una actividad cerebral al músculo), negativa (del músculo al cerebro) y la actividad que tiene un retardo 0 (que para registros de EMG se produce cuando hay una conducción volumétrica de la actividad eléctrica, y que, por lo tanto, no se debe a una transmisión a través de una vía neuronal). En el caso concreto de este estudio, la estimación espectral se hizo en ventanas no solapadas de 1 segundo de duración y se utilizó el método de *multitapers* con 3 *tapers* (Fig. 11), esto son ventanas aplicadas para la estimación de los componentes frecuenciales. El empleo de varias ventanas simultáneas permite un mejor resultado del sesgo y la varianza, usualmente afectados por la ventana aplicada ⁴⁶. Una vez estimada la CMC direccional, se obtuvo el valor máximo de la coherencia en la banda de frecuencias beta (15-30 Hz).

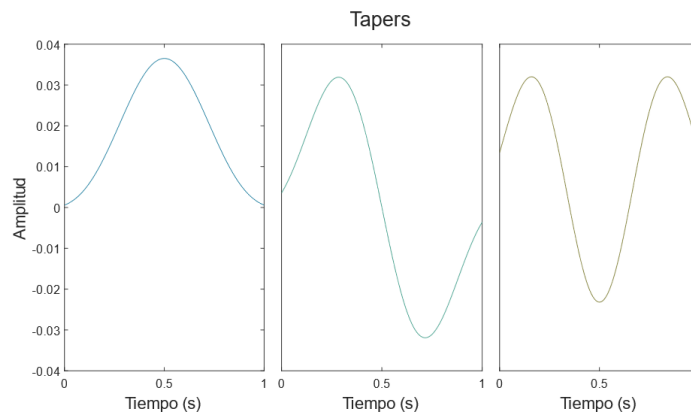


Figura 11. Representación de los *tapers* utilizados en el cálculo de la coherencia con el método de *multitapers*.

Se calcularon todas las medidas con las señales de EMG sin rectificación (Fig. 12 Superior) y aplicando la rectificación (Fig. 12 Inferior), transformación que se utiliza habitualmente para mejorar los componentes oscilatorios de baja frecuencia. Esto es debido a que los potenciales de acción de la unidad motora tienen poca potencia a frecuencias por debajo de 10-20 Hz, por ello, al convolucionar los trenes de pulsos actúan como un filtro paso alto para medidas de la coherencia en esas frecuencias ^{47,48}. Sin embargo, se ha reportado en estudios recientes que la rectificación puede distorsionar la estimación de entradas sinápticas comunes cuando se estudian frecuencias beta, de una manera dependiente de la duración de los potenciales de acción, y puede introducir picos en la función de coherencia que no corresponden a entradas fisiológicas compartidas ^{47,48}. Los resultados presentados en este documento pertenecen a las señales no rectificadas, ya que, tal y como se esperaba de acuerdo con dichos trabajos recientes, con la rectificación se obtuvieron niveles de CMC inferiores.

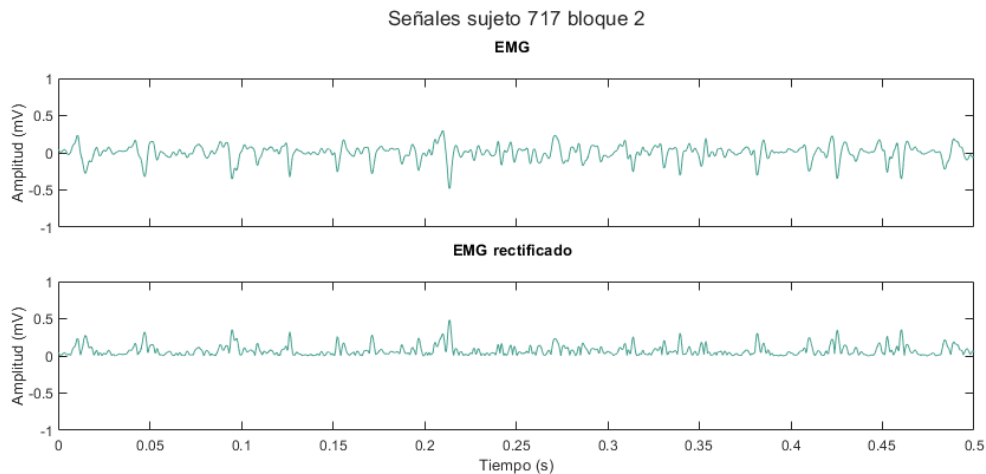


Figura 12. Representación ejemplo de señal EMG previo y posterior al cálculo de la rectificación. Se muestra el primer canal de la señal de HD-EMG acotado a 500 ms, del sujeto 717 en la segunda repetición.

Actividad de unidades motoras

Como se ha mencionado anteriormente, la descomposición de la señal en MUs proporciona una estimación directa del impulso neuronal al músculo eliminando los efectos de la forma de los potenciales de acción. Sin embargo, estos métodos solo pueden identificar un limitado número de MUs activas simultáneamente^{33,35}. Con la intención de estudiar sus ventajas y limitaciones respecto a otro tipo de análisis de la matriz HD-EMG, se analizó el progreso de la coherencia en función del número de MUs reclutadas. Esto se llevó a cabo mediante el cálculo del *composite spike train* (CST) para estimar la actividad neuronal neta que le llega a un músculo. El CST se define como la suma de trenes de picos (*spikes*) de todas las MUs (Fig. 13), y la secuencia resultante corresponde a un proceso de muestreo de la amplitud de la entrada compartida¹⁵.

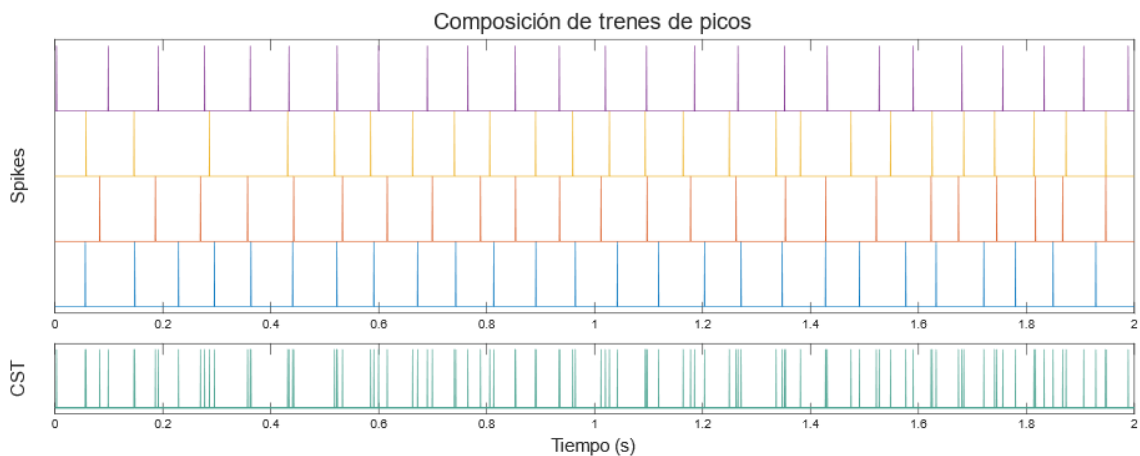


Figura 13. Representación de la composición de trenes de picos acotada a 2 s, se compone una señal ejemplo *CST* con cuatro *spikes*.

Con el fin de estudiar la evolución y el muestreo llevado a cabo por las MUs, la coherencia se calcula considerando subconjuntos de distinto número de MUs (desde 1 hasta el máximo de unidades extraídas para la señal considerada). Para la obtención de una

medida más estable se realizan 100 agrupaciones aleatorias de cada tamaño y se promedian las coherencias. En la representación de coherencia en función del tamaño de subconjunto se evaluó la progresión, analizando si, como es de esperar, mostraban una tendencia creciente que se ajusta visualmente a una función exponencial invertida (Ec. 1) (Fig. 14). Se utilizó la función de MATLAB *fit* para determinar los parámetros óptimos de la función exponencial considerada y evaluar su adecuación a los datos. Finalmente, se calculó el valor asintótico del ajuste y el número de MUs al que se alcanzaría con un error menor del 1%.

$$y = -a \cdot \exp(-b \cdot x) + c \quad \text{Ecuación 1}$$

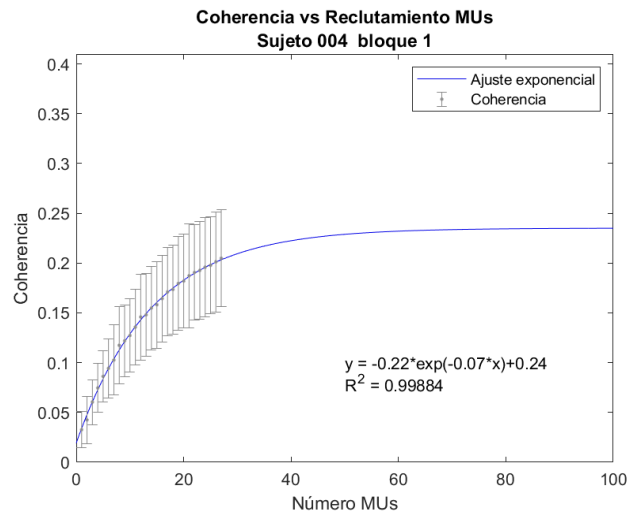


Figura 14. Ejemplo ajuste exponencial en datos de coherencia en función del número de MUs reclutadas. Se muestra con los datos del sujeto 004 en la primera repetición.

Registro bipolar

Dado que, actualmente, el registro de referencia es el bipolar, se estimó el mismo utilizando un conjunto de canales para simular los electrodos. Se calculó como la diferencia entre los promedios de dos regiones de la matriz compuestas por cinco electrodos formando una cruzeta (5 mm de diámetro y 10 mm de distancia entre centros aproximadamente, son medidas utilizadas frecuentemente) ⁴⁹ (Fig. 15).

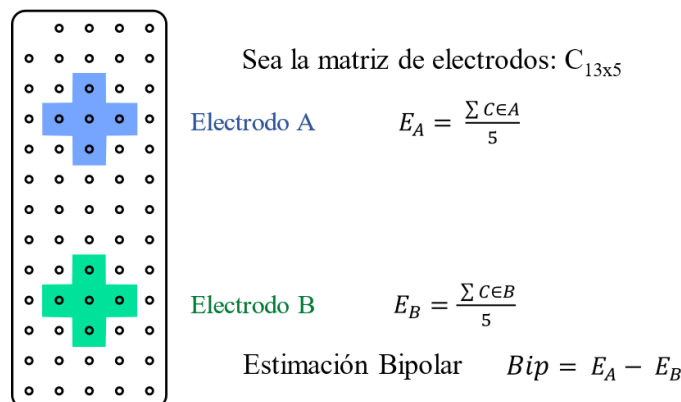


Figura 15. Esquema del cálculo de la estimación bipolar a partir de la matriz de HD-EMG. Se muestra la representación de los dos electrodos estimados en colores distintos sobre la matriz de canales del HD-EMG y las ecuaciones correspondientes.

Proyección óptima

Una transformación novedosa de la matriz de canales que se está aplicando cada vez con más frecuencia es la optimización de la combinación de los canales de la matriz de HD-EMG, que busca la compensación temporal y/o derivación espacial que maximice la coherencia. Su sentido radica en la sensibilidad de las señales de EMG de superficie al reposicionamiento de los electrodos, los cambios en la impedancia de la piel del electrodo (por ejemplo, debido a la sudoración), el movimiento relativo del músculo con respecto a los electrodos, incluido el alargamiento y acortamiento de la fibra muscular^{29-31,50}. En este caso, se considera trivial el desfase temporal y se utiliza un enfoque de optimización espacial directa para encontrar la combinación óptima de pesos de los canales con el objetivo de maximizar la coherencia. Este método permite una mayor flexibilidad en la definición del problema y la acotación de resultados.

Buscamos la combinación lineal óptima de los canales. El cálculo de los pesos de los canales se realizó con la función *fminsearchbnd* de MATLAB, adaptación de la función *fminsearch* que posibilita establecer límites a las variables. Utiliza el algoritmo *simplex* de Nelder-Mead⁵¹ para la obtención de un mínimo en la función objetivo (Ec. 2). Como criterio de parada es posible definir distintos parámetros, en este caso se consideró de interés utilizar una tolerancia de la variable x (en este caso los pesos estimados) y una tolerancia de la evaluación de la función con potencias de exponente más alto (E-2) que el utilizado por defecto (E-4) para evitar sobreentrenamiento del sistema (se utilizó en ambas variables un valor de 3E-2)(Fig. 16). Se ha llevado a cabo una reducción de la dimensionalidad debido a la complejidad del sistema y con la finalidad de facilitar el proceso de optimización. Esta reducción comprende la selección de los componentes principales que expliquen un 95% de la varianza de la señal (reducción dimensional suficiente un entrenamiento óptimo), utilizando la función *pca* de MATLAB. Para la selección de los parámetros adecuados de parada se han realizado comparativas de los resultados de la optimización utilizando distintos valores de tolerancia (entre 1E-2 y 5E-2) Se elige 3E-2 porque es el valor que con menor número de iteraciones aporta un resultado óptimo de la coherencia (Anexo 2).

$$f(a) = -\text{coherencia}\beta (EEG, a \cdot EMG)$$

Ecuación 2

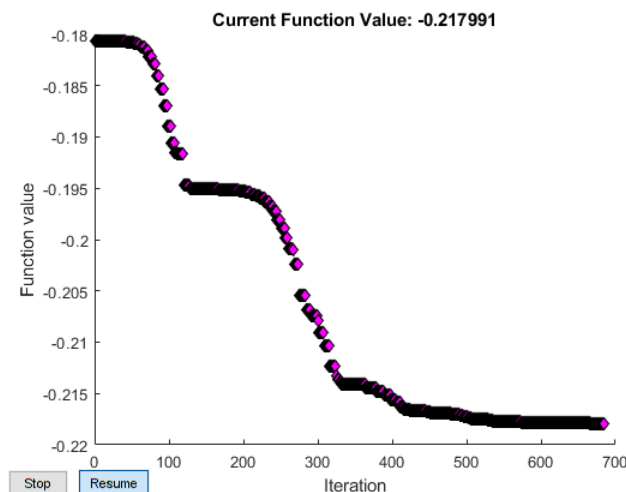


Figura 16. Ejemplo de la optimización de la coherencia en función del número de iteraciones.

En la figura 17 se ilustra el proceso de transformación de la señal mediante la optimización de las proyecciones de los canales de registro, para ello se dividió la señal en segmentos de 1 segundo, se utilizaron 39 concatenados para el entrenamiento de los pesos con los que se modifica el segmento restante. De esta forma evitamos el sobreentrenamiento y no se pierde una proporción de datos en entrenar. El entrenamiento se llevó a cabo formando todas las agrupaciones posibles de 38 segmentos concatenados en orden natural, y promediando los pesos obtenidos. El producto del segmento a modificar (S_k en la figura 17) por el vector promedio de pesos resultante del entrenamiento (\bar{a}_k en dicha figura) da lugar a una transformación de cada segmento de la señal (S'_k en la misma figura), estos segmentos concatenados formarían la señal modificada que podría mejorar la estimación de la entrada neuronal a los músculos.

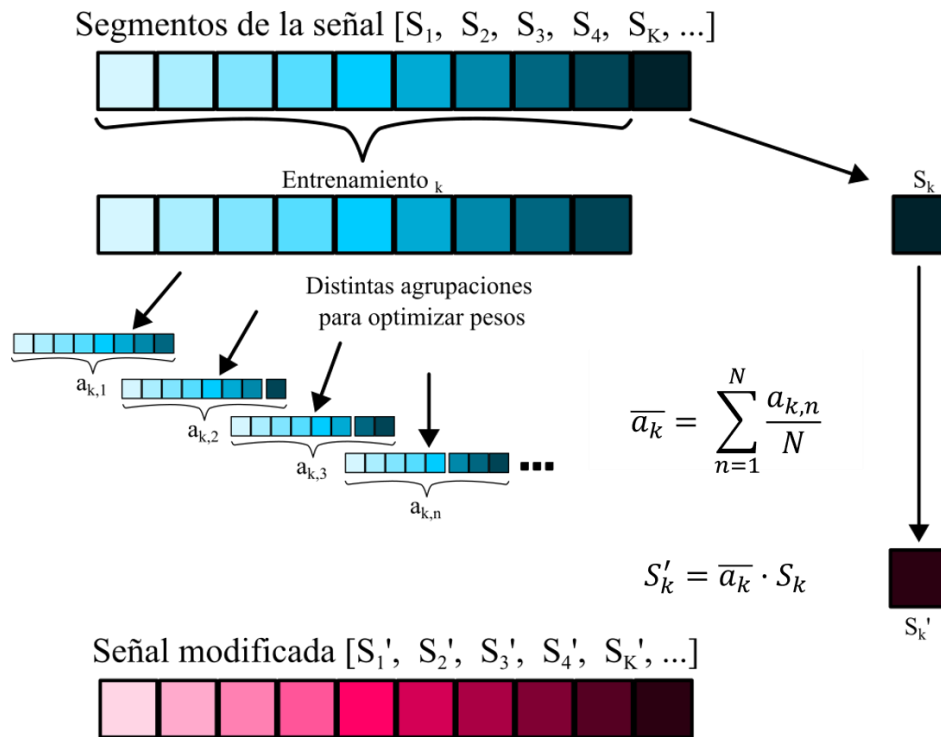


Figura 17. Esquema de la transformación de la señal por optimización de la proyección de los canales. Todos los entrenamientos se llevan a cabo con los segmentos de la señal original. En cada repetición se modifica un segmento de la señal, que se reserva para la concatenación de la señal modificada.

Ráfagas de activación en beta

Como se ha mencionado, estudios recientes indican que la actividad beta cortical no es una señal continua, sino que aparece en “ráfagas” de corta duración. Esto sugiere que la sincronización neuronal entre el cerebro y el músculo implica eventos de corta duración de conectividad específica de frecuencia, incluso cuando las demandas de tareas y el comportamiento motor se mantienen. Así, es posible acotar la señal a los periodos de actividad en beta para obtener una mejor caracterización de la entrada neuronal a los músculos ^{11,18}.

Teóricamente, seleccionar los segmentos en los que ocurre la transmisión lineal de la señal significaría tener una menor distorsión de la transmisión y, por tanto, un mayor valor de la coherencia. Con la finalidad de comprobar esta premisa, se extrajeron de las señales

registradas intervalos de tiempo en los que se identificó la existencia de ráfagas en beta. Para esto, en primer lugar, se filtró la señal en este rango (15 - 30 Hz), se rectificó y se obtuvo la envolvente mediante aplicación de un filtro paso bajo Butterworth de cuarto orden y retraso cero con frecuencia de corte en 6 Hz. A continuación, se identificaron los picos de la señal obtenida, seleccionando aquellos picos que superaban un determinado umbral (media + desviación típica). El siguiente paso fue la definición de las ráfagas de activación en beta como segmentos de 250 ms (para lograr una resolución espectral de 4 Hz) centrados en dichos picos, que se aproxima a la que se ha aplicado anteriormente en otros estudios ^{11,52}. Se utilizaron las ráfagas para cortar los fragmentos de la señal, se concatenaron y se utilizaron como datos iniciales de EEG y EMG (Fig. 18 Superior), repitiendo las transformaciones citadas anteriormente. Los resultados se concatenaron utilizando una ventana de Hann adaptada (Fig. 18 Centro) para evitar posibles saltos entre segmentos. (Fig. 18 Inferior).

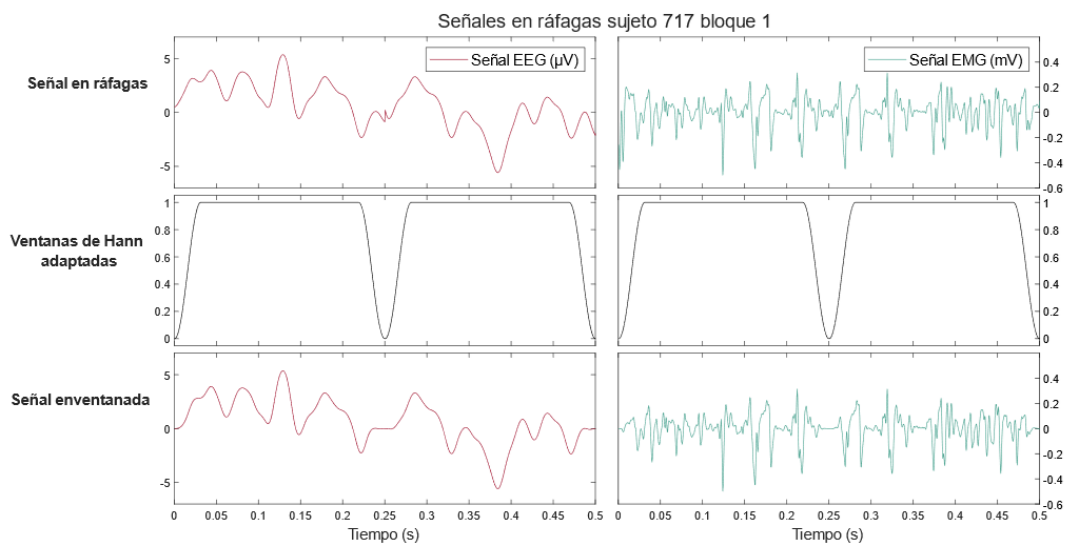


Figura 18. Ejemplificación de las señales acotadas a las ráfagas de activación en beta. Se representan las ventanas adaptadas y las señales sin y con la aplicación de estas ventanas.

Representaciones y estadística

Los resultados se representan independientemente para cada bloque y sujeto en un diagrama de caja que permite comparar la mediana y la dispersión de la coherencia en cada uno de los casos considerados. Además, cada sujeto se ilustra con un punto de determinado color, y diferente tonalidad según el bloque, de manera que es posible visualizar también las diferencias individuales.

Adicionalmente, se ha representado espacialmente la primera componente principal (más explicativa de la varianza), así como, el promedio de los pesos obtenidos en los entrenamientos en la optimización (Anexo 3). Aportando información sobre las regiones con mayor transmisión de la señal y permitiendo la comparativa entre sujetos.

En cuanto a los análisis estadísticos, se llevaron a cabo un conjunto de procedimientos. En primer lugar, se comprobó la existencia de datos espurios utilizando el método ROUT (Remove Outliers) ⁵³, dado que estos podrían distorsionar los resultados. A continuación, se realizó un test de normalidad Shapiro-Wilk ⁵⁴ (aplicable a conjuntos de

muestras menores de 50) a partir del cual se decidió si se utilizaría un test paramétrico (test de comparaciones múltiples Tukey ⁵⁵), en caso de normalidad, o no paramétrico (test Kruskal-Wallis ⁵⁶ y test de comparaciones múltiples de Dunn ⁵⁷), en caso contrario. Los resultados de significación estadística se añadirán a los diagramas de cajas aplicando las normas APA (American Psychological Association) ⁵⁸. Los valores resultantes de los test estadísticos se presentarán en tablas en el Anexo 4. El estilo APA presenta tres intervalos, definidos con distinto símbolo, para la representación del P valor significativo en una gráfica: $\leq 0,001$ se representa con '***', $\leq 0,01$ se representa con '**' y $\leq 0,05$ se representa con '*'.

4. Resultados

La finalidad de este estudio es la realización de un análisis comparativo de distintas técnicas de procesamiento de la señal de HD-EMG con objeto de estudiar la transmisión corticomuscular en la banda beta. Se ha empleado la medida de CMC para estimar coherencia entre el EEG y distintas versiones de la señal neuronal que llega a los músculos.

Resultados de descomposición de MUs

En relación a la señal de descomposición de MUs, se pudo descomponer un promedio de $26,1 \pm 8,7$ MUs. Aplicando los criterios descritos anteriormente para mantener MUs válidas para este estudio, se conservó un $82,7 \pm 13,1$ % del total de MUs descompuestas (Tabla 1).

Tabla 1. MUs detectadas y conservadas por sujeto y bloque.

Sujeto	Bloque	MUs detectadas	MUs conservadas	% MUs conservadas
002	1	13	10	76,9
	2	13	8	61,5
004	1	30	27	90,0
	2	30	29	96,7
400	1	26	25	96,2
	2	23	22	95,7
706	1	17	11	64,7
	2	18	11	61,1
710	1	36	34	94,4
	2	34	30	88,2
717	1	37	32	86,5
	2	36	29	80,6
Promedio		$26,1 \pm 8,7$	$22,3 \pm 9,2$	$82,7 \pm 13,1$

Análisis de los datos

Actividad de unidades motoras

En la figura 19 se muestra la representación de la progresión de la coherencia en función del número de MUs reclutadas. En todos los casos se realizó un ajuste de los datos a una función exponencial con un R^2 mayor a 0,99, siendo el modelo adecuado para describir los datos (detallado en Anexo 5). Esto permitió estimar el valor máximo de coherencia que se podría obtener con una descomposición óptima y el número de MUs necesario para alcanzar dicho valor.

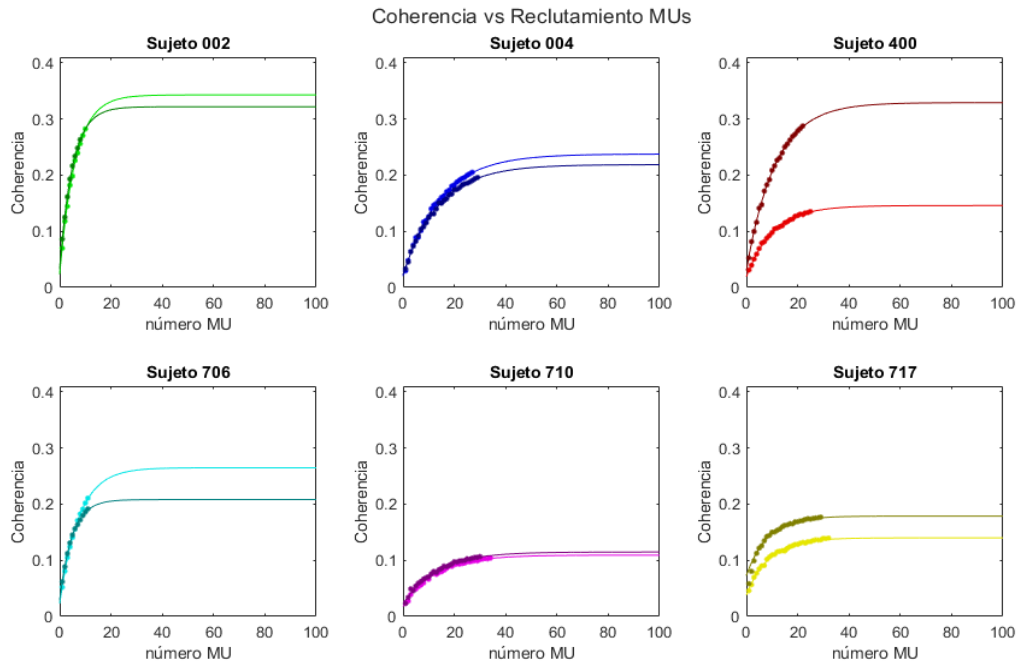


Figura 19. Representación de la progresión de la coherencia en función del grupo de MUs considerado. Se muestra una gráfica por sujeto, incluyendo las dos repeticiones en distinto color. De manera simplificada los datos se representan como puntos y el ajuste como una línea continua. Se presentan las gráficas de forma más detallada, incluyendo barras de error y ecuación de ajuste en el Anexo 5.

En la tabla 2 se muestra la relación entre las MUs descompuestas que cumplen los criterios de fiabilidad y el valor de MUs a partir del cual se estima que el ajuste ha llegado al máximo valor de coherencia (error menor al 1%), se considera este valor como el número de MUs representativas de la población. Cabe destacar que dicho conjunto de MUs es de un tamaño variable dependiendo del sujeto e incluso de la réplica considerada (bloque 1 o bloque 2). Es importante mencionar que el porcentaje de MUs descompuestas en relación a las representativas es considerablemente bajo, siendo de un $52,1 \pm 16,8 \%$.

Tabla 2. MUs representativas y descompuestas por sujeto y bloque.

Sujeto	Bloque	MUs representativas	MUs descompuestas	% MUs descompuestas
002	1	28	10	35,7
	2	23	8	34,8
004	1	64	27	42,2
	2	62	29	46,8
400	1	47	25	53,2
	2	51	22	43,1
706	1	34	11	32,4
	2	22	11	50,0
710	1	55	34	61,8
	2	56	30	53,6
717	1	38	32	84,2
	2	34	29	85,3
Promedio		$42,8 \pm 14,3$	$22,3 \pm 9,2$	$52,1 \pm 16,8$

Transformaciones de la señal de HD-EMG

Por último, se presentan comparativas de coherencia mediante diagramas de caja. Estas comparativas se realizaron entre: la estimación del registro bipolar, la optimización de la proyección de canales en HD-EMG y el valor máximo estimado de coherencia a partir del ajuste de la progresión de MUs. Además, a continuación, se muestra la misma comparativa incluyendo las transformaciones con los datos restringidos a la actividad en la banda beta.

En la figura 20 se puede observar que, para todos los sujetos, la coherencia es mayor en la optimización de la proyección de canales en comparación con la estimación del registro bipolar. De hecho, se ha comprobado estadísticamente que, con un valor de $0,26 \pm 0,11$ resulta significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que la coherencia bipolar: $0,09 \pm 0,05$. De igual manera, ocurre que la coherencia bipolar estimada es menor que el máximo valor estimado en la evolución de coherencia respecto al número de MUs reclutadas para todos los sujetos. Y nuevamente esta diferencia es significativa a nivel poblacional ($p \leq 0,05$), con valores de $0,09 \pm 0,05$ y $0,22 \pm 0,08$, respectivamente. No obstante, al comparar la optimización de la proyección de canales y el ajuste de la progresión de MUs, el primero es mayor para todos los sujetos y bloques excepto dos, cuyos valores de coherencia resultan muy semejantes para la optimización y el ajuste (en el Anexo 6 se añaden representaciones por sujeto donde la comparativa se observa con mayor claridad). Sin embargo, estas dos poblaciones de datos ($0,26 \pm 0,11$ y $0,22 \pm 0,08$) no muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

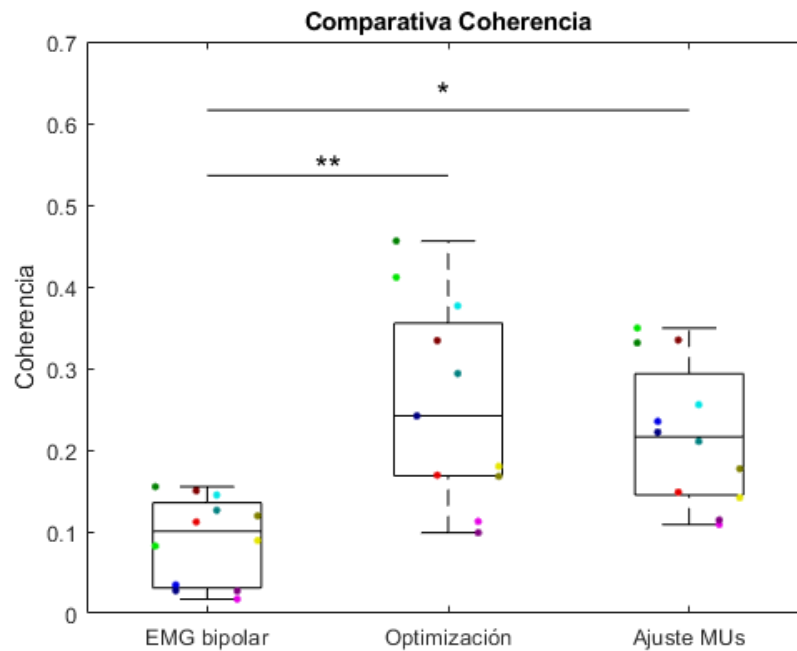


Figura 20. Diagrama de caja comparativo de diferentes tratamientos de la señal de HD-EMG. Concretamente se muestra: estimación bipolar, optimización de proyección de canales y ajuste de progresión de MUs. El resultado del análisis estadístico se muestra en la parte superior aplicando la normativa APA, en la que ' ** ' y ' * ' reflejan diferencias significativas de $\leq 0,05$ y $\leq 0,01$, respectivamente.

Ráfagas de activación en beta

La figura 20 representa las comparaciones entre los distintos tipos de registros de actividad neuronal en los músculos añadiendo las respectivas coherencias entre señales acotadas a las ráfagas de activación en la banda beta.

Teniendo en cuenta en los diagramas de la derecha en los tres cuadrantes representados (estimaciones para señales acotadas en ráfagas) se observa una tendencia similar a la observada anteriormente para las señales completas. Nuevamente, la proyección optimizada, con un valor de $0,33 \pm 0,13$ es significativamente mayor que la estimación bipolar, de valor $0,15 \pm 0,10$ ($p \leq 0,05$). Sin embargo, el ajuste exponencial de coherencia en función del reclutamiento de MUs ($0,22 \pm 0,08$) no presenta diferencias significativas con la optimización de la proyección de HD-EMG ni con la coherencia de EMG bipolar estimada.

Por otro lado, al comparar las medidas de coherencia de la señal completa con las medidas de la señal restringida a la actividad en beta (cada cuadrante representado) se obtienen mejores resultados en la optimización ($0,33 \pm 0,13$ en comparación con la coherencia de la señal completa: $0,26 \pm 0,11$) y la estimación bipolar ($0,15 \pm 0,10$, a comparar con la coherencia de la señal completa: $0,09 \pm 0,05$), pero apenas varían en el ajuste exponencial de la progresión de MUs ($0,22 \pm 0,08$ respecto a $0,22 \pm 0,11$). No obstante, ninguno de los tres casos presenta diferencias significativas.

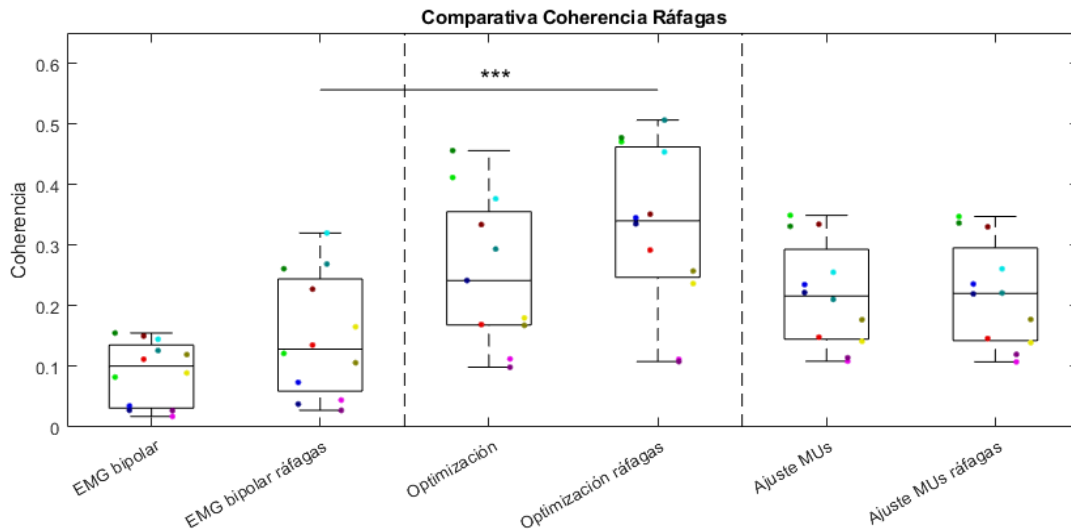


Figura 20. Diagrama de caja comparativo de diferentes tratamientos de la señal de HD-EMG completa y restringida a la activación en la banda beta. Concretamente se muestra: estimación bipolar, optimización de proyección de canales y ajuste de progresión de MUs de cada caso, representados en los cuadrantes de izquierda a derecha, respectivamente. El resultado del análisis estadístico se muestra en la parte superior aplicando las normas APA, así, '***' refleja diferencias significativas de $\leq 0,001$. Para mayor claridad el análisis considerado en el apartado anterior no se refleja en esta gráfica.

Patrones de información espacial

En la representación espacial de los componentes principales (Anexo 3) se han observado regiones de mayor explicación de la varianza. Estas regiones presentan una gran variabilidad entre los sujetos estudiados y no siempre coinciden con los canales de mayor proyección según la optimización, que también difieren mucho entre sujetos.

5. Discusión

El estudio de la transmisión de la actividad cortical rítmica a los músculos ayuda a entender mejor cómo el cerebro se comunica con ellos. En este trabajo se estudian dos temas principales: la evolución de la coherencia en función del número de MUs reclutadas, y las diferencias que existen entre la máxima CMC estimada de dicha evolución y la CMC calculada con la señal de HD-EMG. Esto ayuda a comprender la diferencia de información neuronal contenida en ambos tipos de señales y el modo en que los ritmos beta corticales se propagan al conjunto de motoneuronas en un músculo determinado. Además, permite valorar las limitaciones de los métodos de descomposición del EMG en MUs.

Asimismo, con la comparativa de la estimación bipolar y la aplicación de transformaciones adicionales como la rectificación o la extracción de ráfagas de actividad en beta es posible evaluar la mejora potencial de los registros y transformaciones utilizados habitualmente.

Respecto a la primera cuestión planteada, se ha visto en todos los casos una evolución creciente de la coherencia, de forma que cuanto mayor es el número de MUs considerado, mayor es la CMC. Sin embargo, el grado de aumento de la coherencia es cada vez menor. Esto se debe a que las neuronas motoras tienen, como se ha comentado, una entrada común, y es el muestreo de esta señal lo que se refleja en la coherencia. Por esa razón, se considera que el valor de la asíntota puede representar la máxima CMC que se puede obtener de la población de MUs considerando una distribución uniforme de la entrada común. De hecho, se ha comprobado que dicho valor se alcanza aproximadamente con el doble de MUs de las que se han logrado descomponer ($52,1 \pm 16,8$ % de dicho valor máximo), demostrando así las limitaciones de los métodos de descomposición del HD-EMG en MUs.

Si se considera el segundo punto, al comparar los valores de coherencia de la asíntota del ajuste con los de la optimización de la proyección del HD-EMG, se esperaría que con una distribución uniforme de la entrada en beta a las MUs se obtuviese aproximadamente el mismo valor. Aunque los valores de coherencia con la optimización fueron superiores para todos los sujetos y bloques excepto dos, la diferencia poblacional no es significativa. Por esa razón, se podría considerar que en los sujetos estudiados la distribución de la entrada común a frecuencias beta es uniforme para las MUs que contribuyen a la señal de HD-EMG en el músculo de estudio.

En cuanto a la comparativa entre el registro bipolar (registro de referencia en electromiografía) y la optimización de la transformación del registro multicanal, se puede concluir que la señal de HD-EMG contiene información significativamente más representativa de la transmisión corticomuscular y demuestra que las actuales técnicas de descomposición de EMG pueden aún ser ampliamente mejoradas en el futuro para aprovechar toda la información que contiene la señal de EMG.

Por otra parte, es interesante comentar la variabilidad entre sujetos mostrada en las representaciones espaciales de los componentes principales y los pesos de los canales de HD-EMG obtenidos de la optimización. En primera instancia, las regiones de mayor explicación de la varianza que se observan en las figuras podrían indicar la región central del músculo. Sin embargo, no coinciden entre sujetos debido a las diferencias fisiológicas, de realización del movimiento y de colocación de la malla de electrodos. También cabe la posibilidad de que los componentes principales extraídos representen algún tipo de ruido

que no ha sido posible eliminar y, por tanto, no se observarían relacionados con los canales que mayor peso presentan en la optimización, como ocurre en algunos de los datos. En todo caso, la optimización de los canales permitiría una adaptación de la combinación de canales a las diferencias descritas y a la reducción de canales utilizada.

Finalmente, al contemplar la utilización de las ráfagas de actividad en beta para eliminar los periodos de la señal que no presentan esta actividad y, por tanto, podrían afectar a la estimación de la CMC. Sin embargo, con la metodología llevada a cabo en este estudio para la definición y extracción de ráfagas, no se han encontrado diferencias significativas. Este resultado sugiere que la transmisión de actividad beta se produce en todo momento o, de lo contrario (en caso de transmisión por ráfagas), en los periodos de no activación en beta la actividad es prácticamente nula en ambas señales (EEG y EMG). La explicación en este último caso es que al ser la coherencia una medida normalizada por los autoespectros, si existe actividad beta durante los periodos de “no ráfagas” y esta información no viaja a los músculos, esta actividad no nula reduciría la CMC. Se obtendría el mismo efecto en caso contrario en el que los músculos presentaran actividad en beta, pero esta no se viese reflejada en el EEG.

Este estudio, al igual que muchos otros, presenta varias limitaciones. En primer lugar, el reducido número de sujetos, que puede limitar la representatividad de la muestra y dificultar la extracción de conclusiones generales; además, es posible que la variabilidad inherente sea alta y los resultados no sean consistentes. También, la corta duración de los bloques de registro utilizados limita la obtención de medidas robustas, ya que es posible que no se capturen adecuadamente las características de la señal afectando a la validez de los resultados. En cuanto a los análisis llevados a cabo, el número limitado de MUs descompuestas puede afectar al ajuste, siendo este más inestable debido al uso de pocos datos y muy cercanos para estimar la tendencia. Además, los tiempos de procesamiento computacional para la optimización de la proyección de los canales de HD-EMG fueron muy largos, imposibilitando su uso en aplicaciones de datos en tiempo real. Por otra parte, existe una dificultad intrínseca al tratar estas señales, ya que no hay pautas o procedimientos estándar que indiquen la forma de obtener resultados consistentes. A esto se suma la variabilidad entre individuos e incluso entre repeticiones, lo que dificulta la obtención de mediciones repetibles y generalizables.

6. Conclusiones

En resumen, este estudio proporciona una nueva perspectiva en el estudio de la transmisión corticomuscular, que podría contribuir al conocimiento sobre la evolución de la coherencia corticomuscular en función de las unidades motoras reclutadas y la distribución de las entradas neuronales a los músculos.

De los resultados obtenidos se deduce la existencia de una distribución uniforme de la entrada común en beta a las distintas neuronas motoras y la posibilidad de que los periodos de activación en beta sean inexistentes o no afecten al cálculo de la coherencia corticomuscular. Además, se demuestran las limitaciones de la descomposición utilizada para extraer la señal de las unidades motoras de la señal de electromiografía. Así como, la ineficiencia de los registros bipolares utilizados ampliamente en este campo y se presenta una mejora de resultados utilizando combinaciones óptimas de los canales de electromiografía de alta densidad.

Sin embargo, la optimización de los pesos de estos canales presenta una carga computacional elevada, dando lugar a extensos tiempos de espera, y esto limita su aplicación. Además, las características de los datos y la utilización de transformaciones no replicadas en estudios previos no permiten una generalización de los resultados. No obstante, aunque los resultados de un único estudio no resultan concluyentes, dan pie a la consideración de estos para estudios futuros.

En la misma línea de este proyecto, como trabajos futuros podría considerarse, además del registro de un mayor número de datos y de mayor longitud, el empleo de otras técnicas de descomposición del electromiograma en unidades motoras y otros tipos de composición de los canales de electromiografía de alta densidad más directos para disminuir los tiempos de procesamiento. Incluso sería conveniente contemplar la utilización de simulaciones, que podrían ser de gran utilidad para la comprobación de ciertas hipótesis. Otra vía interesante de estos estudios sería la aplicación de redes neuronales, ya que, con un entrenamiento adecuado, tal vez sería posible la estimación directa del *composite spike train* o incluso de la componente beta de las señales. Finalmente, en estudios más aplicados, se podría analizar la transmisión corticomuscular en distintas patologías relacionadas e incluso orientar su aplicabilidad a dispositivos de control y rehabilitación.

7. Bibliografía

1. McGovern Medical School at UTHealth Department of Neurobiology and Anatomy. Neuroscience Online, an electronic textbook for the neurosciences. <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/toc.htm>.
2. Ghez C, Krakauer J. *Principles of Neural Science*. Vol 4.; 2000.
3. Cheung VCK, d'Avella A, Bizzi E. Adjustments of Motor Pattern for Load Compensation Via Modulated Activations of Muscle Synergies During Natural Behaviors. *J Neurophysiol*. 2009;101(3):1235-1257. doi:10.1152/jn.01387.2007
4. Lee WA. Neuromotor Synergies as a Basis for Coordinated Intentional Action. *J Mot Behav*. 1984;16(2):135-170. doi:10.1080/00222895.1984.10735316
5. Campanini I, Disselhorst-Klug C, Rymer WZ, Merletti R. Surface EMG in Clinical Assessment and Neurorehabilitation: Barriers Limiting Its Use. *Front Neurol*. 2020;11. doi:10.3389/fneur.2020.00934
6. Iandolo R, Marini F, Semprini M, et al. Perspectives and Challenges in Robotic Neurorehabilitation. *Applied Sciences*. 2019;9(15):3183. doi:10.3390/app9153183
7. Ison M, Vujaklija I, Whitsell B, Farina D, Artemiadis P. High-Density Electromyography and Motor Skill Learning for Robust Long-Term Control of a 7-DoF Robot Arm. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*. 2016;24(4):424-433. doi:10.1109/TNSRE.2015.2417775
8. Dwivedi A, Kwon Y, Liarokapis M. EMG-Based Decoding of Manipulation Motions in Virtual Reality: Towards Immersive Interfaces. In: *2020 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics (SMC)*. IEEE; 2020:3296-3303. doi:10.1109/SMC42975.2020.9283270
9. Watanabe RN, Kohn AF. Fast Oscillatory Commands from the Motor Cortex Can Be Decoded by the Spinal Cord for Force Control. *The Journal of Neuroscience*. 2015;35(40):13687-13697. doi:10.1523/JNEUROSCI.1950-15.2015
10. Chakarov V, Naranjo JR, Schulte-Mönting J, Omlor W, Huethe F, Kristeva R. Beta-Range EEG-EMG Coherence With Isometric Compensation for Increasing Modulated Low-Level Forces. *J Neurophysiol*. 2009;102(2):1115-1120. doi:10.1152/jn.91095.2008
11. Echeverria-Altuna I, Quinn AJ, Zokaei N, Woolrich MW, Nobre AC, van Ede F. Transient beta activity and cortico-muscular connectivity during sustained motor behaviour. *Prog Neurobiol*. 2022;214:102281. doi:10.1016/j.pneurobio.2022.102281
12. Shin H, Law R, Tsutsui S, Moore CI, Jones SR. The rate of transient beta frequency events predicts behavior across tasks and species. *Elife*. 2017;6. doi:10.7554/eLife.29086
13. Ibáñez J, Del Vecchio A, Rothwell JC, Baker SN, Farina D. Only the Fastest Corticospinal Fibers Contribute to β Corticomuscular Coherence. *The Journal of Neuroscience*. 2021;41(22):4867-4879. doi:10.1523/JNEUROSCI.2908-20.2021
14. Halliday DM, Conway BA, Farmer SF, Rosenberg JR. Using electroencephalography to study functional coupling between cortical activity and electromyograms during voluntary contractions in humans. *Neurosci Lett*. 1998;241(1):5-8. doi:10.1016/S0304-3940(97)00964-6
15. Negro F, Farina D. Factors Influencing the Estimates of Correlation between Motor Unit Activities in Humans. *PLoS One*. 2012;7(9):e44894. doi:10.1371/journal.pone.0044894

16. Farina D, Negro F, Dideriksen JL. The effective neural drive to muscles is the common synaptic input to motor neurons. *J Physiol.* 2014;592(16):3427-3441. doi:10.1113/jphysiol.2014.273581
17. Baker SN. Oscillatory interactions between sensorimotor cortex and the periphery. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(6):649-655. doi:10.1016/j.conb.2008.01.007
18. Bräcklein M, Barsakcioglu DY, Del Vecchio A, Ibáñez J, Farina D. Reading and Modulating Cortical β Bursts from Motor Unit Spiking Activity. *The Journal of Neuroscience.* 2022;42(17):3611-3621. doi:10.1523/JNEUROSCI.1885-21.2022
19. Liu J, Sheng Y, Liu H. Corticomuscular Coherence and Its Applications: A Review. *Front Hum Neurosci.* 2019;13. doi:10.3389/fnhum.2019.00100
20. Farina D, Castronovo AM, Vujaklija I, et al. Common Synaptic Input to Motor Neurons and Neural Drive to Targeted Reinnervated Muscles. *The Journal of Neuroscience.* 2017;37(46):11285-11292. doi:10.1523/JNEUROSCI.1179-17.2017
21. Ibáñez J, González de la Aleja J, Gallego JA, et al. Effects of Alprazolam on Cortical Activity and Tremors in Patients with Essential Tremor. *PLoS One.* 2014;9(3):e93159. doi:10.1371/journal.pone.0093159
22. Castronovo AM, Negro F, Conforto S, Farina D. The proportion of common synaptic input to motor neurons increases with an increase in net excitatory input. *J Appl Physiol.* 2015;119(11):1337-1346. doi:10.1152/jappphysiol.00255.2015
23. Tuncel D, Dizibuyuk A, Kiyimik MK. Time Frequency Based Coherence Analysis Between EEG and EMG Activities in Fatigue Duration. *J Med Syst.* 2010;34(2):131-138. doi:10.1007/s10916-008-9224-y
24. Cisotto G, Guglielmi A V., Badia L, Zanella A. Classification of grasping tasks based on EEG-EMG coherence. In: *2018 IEEE 20th International Conference on E-Health Networking, Applications and Services (Healthcom).* IEEE; 2018:1-6. doi:10.1109/HealthCom.2018.8531140
25. Kristeva-Feige R, Fritsch C, Timmer J, Lücking CH. Effects of attention and precision of exerted force on beta range EEG-EMG synchronization during a maintained motor contraction task. *Clinical Neurophysiology.* 2002;113(1):124-131. doi:10.1016/S1388-2457(01)00722-2
26. Rojas-Martínez M, Mañanas MA, Alonso JF. High-density surface EMG maps from upper-arm and forearm muscles. *J Neuroeng Rehabil.* 2012;9(1):85. doi:10.1186/1743-0003-9-85
27. Röhrle O, Yavuz UŞ, Klotz T, Negro F, Heidlauf T. Multiscale modeling of the neuromuscular system: Coupling neurophysiology and skeletal muscle mechanics. *WIREs Systems Biology and Medicine.* 2019;11(6). doi:10.1002/wsbm.1457
28. Campanini I, Merlo A, Disselhorst-Klug C, Mesin L, Muceli S, Merletti R. Fundamental Concepts of Bipolar and High-Density Surface EMG Understanding and Teaching for Clinical, Occupational, and Sport Applications: Origin, Detection, and Main Errors. *Sensors.* 2022;22(11):4150. doi:10.3390/s22114150
29. Xu Y, McClelland VM, Cvetkovic Z, Mills KR. Corticomuscular Coherence with Time Lag with Application to Delay Estimation. *IEEE Trans Biomed Eng.* Published online 2016:1-1. doi:10.1109/TBME.2016.2569492
30. Vidaurre C, Nolte G, de Vries IEJ, et al. Canonical maximization of coherence: A novel tool for investigation of neuronal interactions between two datasets. *Neuroimage.* 2019;201:116009. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.116009

31. Sun J, Jia T, Li Z, Li C, Ji L. Enhancement of EEG–EMG coupling detection using corticomuscular coherence with spatial–temporal optimization. *J Neural Eng.* 2023;20(3):036001. doi:10.1088/1741-2552/accd9b
32. Merletti R, Holobar A, Farina D. Analysis of motor units with high-density surface electromyography. *Journal of Electromyography and Kinesiology.* 2008;18(6):879-890. doi:10.1016/j.jelekin.2008.09.002
33. Del Vecchio A, Holobar A, Falla D, Felici F, Enoka RM, Farina D. Tutorial: Analysis of motor unit discharge characteristics from high-density surface EMG signals. *Journal of Electromyography and Kinesiology.* 2020;53:102426. doi:10.1016/j.jelekin.2020.102426
34. Steeg C van de, Daffertshofer A, Stegeman DF, Boonstra TW. High-density surface electromyography improves the identification of oscillatory synaptic inputs to motoneurons. *J Appl Physiol.* 2014;116(10):1263-1271. doi:10.1152/jappphysiol.01092.2013
35. Holobar A, Farina D, Gazzoni M, Merletti R, Zazula D. Estimating motor unit discharge patterns from high-density surface electromyogram. *Clinical Neurophysiology.* 2009;120(3):551-562. doi:10.1016/j.clinph.2008.10.160
36. Farina D, Negro F, Muceli S, Enoka RM. Principles of Motor Unit Physiology Evolve With Advances in Technology. *Physiology.* 2016;31(2):83-94. doi:10.1152/physiol.00040.2015
37. Negro F, Muceli S, Castronovo AM, Holobar A, Farina D. Multi-channel intramuscular and surface EMG decomposition by convolutive blind source separation. *J Neural Eng.* 2016;13(2):026027. doi:10.1088/1741-2560/13/2/026027
38. Negro F, Yavuz UŞ, Farina D. The human motor neuron pools receive a dominant slow-varying common synaptic input. *J Physiol.* 2016;594(19):5491-5505. doi:10.1113/JP271748
39. Day SJ, Hulliger M. Experimental Simulation of Cat Electromyogram: Evidence for Algebraic Summation of Motor-Unit Action-Potential Trains. *J Neurophysiol.* 2001;86(5):2144-2158. doi:10.1152/jn.2001.86.5.2144
40. Rampichini S, Vieira TM, Castiglioni P, Merati G. Complexity Analysis of Surface Electromyography for Assessing the Myoelectric Manifestation of Muscle Fatigue: A Review. *Entropy.* 2020;22(5):529. doi:10.3390/e22050529
41. Stashuk D. EMG signal decomposition: how can it be accomplished and used? *Journal of Electromyography and Kinesiology.* 2001;11(3):151-173. doi:10.1016/S1050-6411(00)00050-X
42. Chowdhury R, Reaz M, Ali M, Bakar A, Chellappan K, Chang T. Surface Electromyography Signal Processing and Classification Techniques. *Sensors.* 2013;13(9):12431-12466. doi:10.3390/s130912431
43. Kilby J, Prasad K, Mawston G. Multi-Channel Surface Electromyography Electrodes: A Review. *IEEE Sens J.* 2016;16(14):5510-5519. doi:10.1109/JSEN.2016.2569072
44. Hug F, Avrillon S, Del Vecchio A, et al. Analysis of motor unit spike trains estimated from high-density surface electromyography is highly reliable across operators. *Journal of Electromyography and Kinesiology.* 2021;58:102548. doi:10.1016/j.jelekin.2021.102548
45. Halliday DM. Nonparametric directionality measures for time series and point process data. *J Integr Neurosci.* 2015;14(02):253-277. doi:10.1142/S0219635215300127
46. Babadi B, Brown EN. A Review of Multitaper Spectral Analysis. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2014;61(5):1555-1564. doi:10.1109/TBME.2014.2311996

47. Negro F, Keenan K, Farina D. Power spectrum of the rectified EMG: when and why is rectification beneficial for identifying neural connectivity? *J Neural Eng.* 2015;12(3):036008. doi:10.1088/1741-2560/12/3/036008
48. Halliday DM, Farmer SF. On the Need for Rectification of Surface EMG. *J Neurophysiol.* 2010;103(6):3547-3547. doi:10.1152/jn.00222.2010
49. Kilby J, Prasad K, Mawston G. Multi-Channel Surface Electromyography Electrodes: A Review. *IEEE Sens J.* 2016;16(14):5510-5519. doi:10.1109/JSEN.2016.2569072
50. Farina D, Jiang N, Rehbaum H, et al. The Extraction of Neural Information from the Surface EMG for the Control of Upper-Limb Prostheses: Emerging Avenues and Challenges. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering.* 2014;22(4):797-809. doi:10.1109/TNSRE.2014.2305111
51. Lagarias JC, Reeds JA, Wright MH, Wright PE. Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM Journal on Optimization.* 1998;9(1):112-147. doi:10.1137/S1052623496303470
52. Bonaiuto JJ, Little S, Neymotin SA, Jones SR, Barnes GR, Bestmann S. Laminar dynamics of high amplitude beta bursts in human motor cortex. *Neuroimage.* 2021;242:118479. doi:10.1016/j.neuroimage.2021.118479
53. Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics.* 2006;7(1):123. doi:10.1186/1471-2105-7-123
54. SHAPIRO SS, WILK MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 1965;52(3-4):591-611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591
55. Tukey JW. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics.* 1949;5(2):99. doi:10.2307/3001913
56. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc.* 1952;47(260):583-621. doi:10.1080/01621459.1952.10483441
57. Dunn OJ. Multiple Comparisons among Means. *J Am Stat Assoc.* 1961;56(293):52-64. doi:10.1080/01621459.1961.10482090
58. *Publication Manual of the American Psychological Association (7th Ed.).* American Psychological Association; 2020. doi:10.1037/0000165-000