



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO DE LA FUNCIÓN MOTORA DE LAS EXTREMIDADES SUPERIORES:

UNA APROXIMACIÓN TRASLACIONAL PARA LA EVALUACIÓN DE TERAPIAS NEUROMODULADORAS EN PERSONAS CON LESIÓN MEDULAR

Tesis Doctoral en Neurociencias  
Septiembre 2021



María Rodríguez Cañón

Dirección: Dr. Guillermo García Alías | Dr. Raimon Jané Campos | Dra. Hatice Kumru Cam

Tutoría: Dra. Roser Nadal Alemany

Departamento de biología celular, fisiología e inmunología. Instituto de Neurociencias.

Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona





# TESIS DOCTORAL

## ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO DE LA FUNCIÓN MOTORA DE LAS EXTREMIDADES SUPERIORES: UNA APROXIMACIÓN TRASLACIONAL PARA LA EVALUACIÓN DE TERAPIAS NEUROMODULADORAS EN PERSONAS CON LESIÓN MEDULAR

---

*(Engl.) A neurophysiological study of the upper extremities  
motor function: a translational approach for the evaluation of  
neuromodulatory therapies in people with spinal cord injury*

*(Cat.) Estudi neurofisiològic de la funció motora de les extremitats  
superiors: una aproximació traslacional per l'avaluació de les  
teràpies neuromoduladoras a persones amb una lesió medul·lar*

María Rodríguez Cañón

Dirección:

Dr. Guillermo García Alías, Dr. Raimon Jané Campos, Dra. Hatice Kumru Cam

Tutoría:

Dra. Roser Nadal Alemany

Programa de doctorado en Neurociencias.

Departamento de biología celular, fisiología e inmunología.

Instituto de Neurociencias. Facultad de Medicina.

Universidad Autónoma de Barcelona.

Septiembre 2021

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias a la concesión del proyecto AC16/00050 a Guillermo García Alías por el programa H2020-Neuron-ERA-NET, financiado por el Instituto de Salud Carlos III, y gestionado por el CIBERNED.

La tesis ha sido realizada en Departamento de biología celular, fisiología e inmunología de la facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), en el grupo de Procesado e interpretación de señales biomédicas del Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), y en el programa de Neuroestimulación y terapias avanzadas del Institut Guttmann.





A Lidia y Siro





## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, mi agradecimiento a mis directores y tutora, por vuestros consejos personales y profesionales durante estos años. En concreto a Guillermo, por confiarme y descubrirme el lado más puro de la ciencia, por las discusiones en la pizarra durante horas y sus inagotables ganas de seguir aprendiendo.

Quiero agradecer a todos los que me habéis acompañado estos años. A los compañeros del departamento por su interés y aportaciones. A Cristina, gracias por tanto. A los compañeros del Ibec, por vuestra superior calidad humana en todos los sentidos, siempre dispuestos a ayudar con una sonrisa. Especialmente gracias a Ignasi y Dolores por su indispensable apoyo. A los investigadores del Guttmann por su acogida y confianza. Mi total admiración por vuestro valiente e incansable trabajo diario ayudando a los pacientes a reinventarse con esperanza y realismo.

A mi familia, porque he tenido una suerte inmensa de nacer en esta casa. Gracias papá y mamá, por vuestro ejemplo y compromiso, y por la determinación en vuestro valiente proyecto en nosotros. A tato, por su comprensión y apoyo. A mis titos, por transmitirme vuestros valores y por enseñarme tantas bonitas formas de ver la vida. Y a la *meiga*, por ser inspiración, gracias por abrirnos el camino.

A ti Cris, por tu incondicional apoyo y tu constante alegría, porque siempre estás sumando. Lo bueno es mejor, y lo malo, menos malo.

Y para los que sabéis quienes sois, gracias por el abrazo constante.

Mis mas sinceras gracias a todos por acompañarme en este proyecto.



# ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS .....	7
ÍNDICE .....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT .....	12
RESUM.....	13
INTRODUCCIÓN .....	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
ESTUDIO 1.....	39
ESTUDIO 2.....	61
ESTUDIO 3 .....	85
DISCUSIÓN.....	139
CONCLUSIONES .....	145
BIBLIOGRAFÍA .....	149
ACTIVIDAD CIENTÍFICA.....	165



## RESUMEN

---

*Castellano*

La pérdida funcional producida tras una lesión medular disminuye en mayor o menor grado la autonomía de los pacientes para desarrollar tareas de la vida diaria. La búsqueda y desarrollo de terapias restauradoras de la función nerviosa están dirigidas a la reconectividad y reparación de la función cortico-medular que permitan al paciente recuperar el control de la movilidad y de la sensibilidad. En los últimos años se han presentado avances en nuevas estrategias neuromoduladoras que han permitido en gran medida la recuperación de la función locomotora en pacientes parapléjicos. No obstante, la implementación y eficacia de estas tecnologías en las extremidades superiores aún no está garantizada y está comenzando a ser estudiada.

La presente tesis está organizado en dos bloques. En primer lugar, se presentan los resultados de dos estudios en los que se ha evaluado los efectos funcionales y neurofisiológicos tras la estimulación transcutánea de la médula espinal cervical en sujetos sanos. Los resultados constatan la neuromodulación de la circuitería cortico-medular tras la aplicación de la estimulación, y la necesidad de definir los parámetros de estimulación y de la concomitante actividad física de las extremidades superiores para optimizar los efectos neuromoduladores.

En segundo lugar, se ha realizado un estudio neurofisiológico en roedores sanos para evaluar el reclutamiento de los músculos de las extremidades delanteras durante la realización de alcance y agarre de objetos. Para ello se han desarrollado herramientas para el análisis y procesado de la actividad eléctrica muscular. Los resultados evidencian una secuenciación temporal y un alto grado de correlación de la actividad muscular entre animales, lo que sugiere la presencia de circuitos medulares responsables del control de estos movimientos. Su caracterización aumenta el conocimiento de la fisiología de estos circuitos para desarrollar en el futuro protocolos neuromoduladores que permitan la restitución funcional de los brazos y manos en personas con lesión de la médula espinal cervical.

## ABSTRACT

---

*English*

The functional loss produced after a spinal cord injury decreases to a greater or lesser degree the autonomy of patients to carry out tasks of daily living. The search and development of restorative therapies for nerve function are aimed at the re Connectivity and repair of the cortico-medullary function that allow the patient to regain control of mobility and sensitivity. In recent years, advances have been made in new neuromodulatory strategies that have largely allowed the recovery of locomotor function in paraplegic patients. However, the implementation and efficacy of these technologies in the upper extremities is not yet guaranteed and is beginning to be studied.

This thesis is organized in two blocks; First, the results of two studies are presented in which the functional and neurophysiological effects have been evaluated after transcutaneous stimulation of the cervical spinal cord in healthy subjects. The results confirm the neuromodulation of the cortico-medullary circuitry after the application of stimulation, and the need to define the stimulation parameters and the concomitant physical activity of the upper extremities to optimize the neuromodulatory effects.

Second, a neurophysiological study has been carried out in healthy rodents to assess the recruitment of the muscles of the forelimbs during reaching and grasping objects. For this, it has been developed for the analysis and processing of muscular electrical activity. The results show a temporal sequencing and a high degree of correlation of muscle activity between animals, which suggests the presence of spinal circuits responsible for the control of these movements. Their characterization increases the knowledge of the physiology of these circuits in order to develop neuromodulatory protocols in the future that allow the functional restoration of the arms and hands in people with cervical spinal cord injury.

### *Catalá*

La pèrdua funcional produïda després d'una lesió medul·lar disminueix en major o menor grau l'autonomia dels pacients per desenvolupar tasques de la vida diària. La recerca i desenvolupament de teràpies restauradores de la funció nerviosa estan dirigides a la reconectivitat i reparació de la funció cortico-medul·lar que permetin al pacient recuperar el control de la mobilitat i de la sensibilitat. En els últims anys s'han presentat avenços en noves estratègies neuromoduladoras que han permès en gran mesura la recuperació de la funció locomotora en pacients paraplàgics. No obstant això, la implementació i eficàcia d'aquestes tecnologies en les extremitats superiors encara no està garantida i està començant a ser estudiada.

La present tesi està organitzada en dos blocs; En primer lloc, es presenten els resultats de dos estudis en què s'ha avaluat els efectes funcionals i neurofisiològics després de l'estimulació transcutània de la medul·la espinal cervical en subjectes sans. Els resultats constaten la neuromodulació de la circuiteria cortico-medul·lar després de l'aplicació de l'estimulació, i la necessitat de definir els paràmetres d'estimulació i de la concomitant activitat física de les extremitats superiors per optimitzar els efectes neuromoduladors.

En segon lloc, s'ha realitzat un estudi neurofisiològic en rosegadors sans per avaluar el reclutament dels músculs de les extremitats davanteres durant la realització d'abast i agafada d'objectes. Per això s'han desenvolupat eines per a l'anàlisi i processament de l'activitat elèctrica muscular. Els resultats evidencien una seqüenciació temporal i un alt grau de correlació de l'activitat muscular entre animals, el que suggereix la presència de circuits medul·lars responsables del control d'aquests moviments. La seva caracterització augmenta el coneixement de la fisiologia d'aquests circuits per desenvolupar en el futur protocols neuromoduladors que permetin la restitució funcional dels braços i mans en persones amb lesió de la medul·la espinal cervical.









## INTRODUCCIÓN

### SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El tejido del sistema nervioso está formado por las neuronas y neuroglía. Las primeras son células especializadas en la transmisión de señales eléctricas que comunican el cerebro con el resto del cuerpo, y las segundas, son células variadas encargadas de aportar soporte, aislamiento y protección a las neuronas. Las neuronas están formadas por un soma o cuerpo celular. De este parten dos prolongaciones, el axón y las dendritas. El axón transmite los impulsos eléctricos y los aleja del soma para finalmente liberar neurotransmisores por contacto en otra célula; y las dendritas, transportan la corriente eléctrica recibida de otras neuronas al soma (Figura 1). Los axones y fibras largas están rodeados de mielina, una sustancia blanquecina que aumenta la velocidad de transmisión del impulso (Marieb 2008).

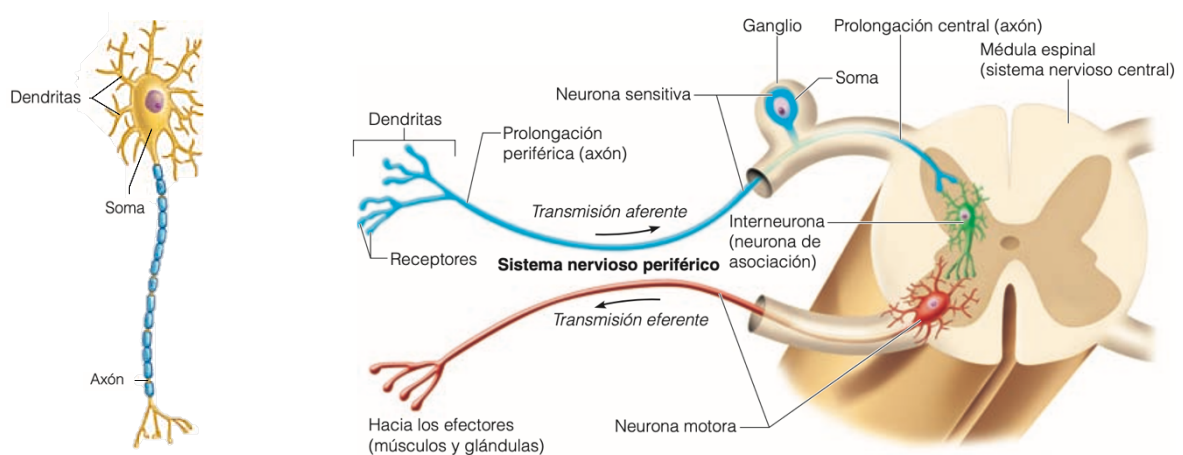


Figura 1: Estructura de una neurona y su distribución en la médula espinal según su función. Copyright © 2009 Pearson Education, Inc, Publishing as Benjamin Cummings.

Anatómicamente el sistema nervioso central se divide en dos subsistemas, el sistema nervioso central formado por el cerebro y la médula espinal; y el sistema nervioso periférico, engloba el sistema ramificado de nervios que comunican la médula espinal con el resto del cuerpo. El sistema nervioso central se divide

## INTRODUCCIÓN

funcionalmente en el sistema sensitivo, gracias al cual es posible de percibir el mundo exterior, y el sistema motor permite la interacción con él mediante la generación de movimientos. Ambos sistemas comparten una organización jerárquica, anatómica, funcional y paralela a lo largo del sistema nervioso central, permitiendo una constante y necesaria comunicación entre ambos. Mediante la integración de información sensitiva, el sistema motor planifica, coordina y ejecuta movimientos con un fin concreto, traduciendo los impulsos eléctricos en contracción de los músculos esqueléticos (Kandle 2013).

Dentro del sistema motor se diferencian dos secciones anatómicas, que son el encéfalo y la médula espinal. Se encuentran jerarquizados según la complejidad de tareas que puedan abordar, y se coordinan en la producción de movimientos.

El encéfalo se encuentra por encima de la médula espinal, protegido por el cráneo. Al encéfalo se le atribuyen funciones como el pensamiento lógico, la conducta moral, las respuestas emocionales y el inicio de la actividad voluntaria. Consta de la corteza cerebral, del tronco del encéfalo y del cerebelo. La corteza se encuentra plegada y tiene circunvalaciones. Se compone de la agrupación de los somas neuronales, que aportan un color grisáceo. La corteza cerebral se subdivide en regiones según su funcionalidad, entre las que se encuentra la corteza motora. La topografía de la corteza motora ha sido caracterizada por Penfield y Rasmussen, según la representación de zonas musculares del cuerpo, aunque no sigue una proporcionalidad con el tamaño de estas zonas (Penfield 1937). Más de la mitad de la corteza motora se encarga de controlar los músculos de las manos y del habla (Figura 2). Las neuronas motoras corticales interactúan entre ellas y con otras de áreas sensitivas, planificando y ejecutando la orden del movimiento.

El tronco del encéfalo se encuentra entre el cerebro y la médula espinal, y además de ser una estructura de paso y procesamiento paralelo de señales tanto ascendentes (sensitivas) como descendentes (motoras) entre el cerebro y la medula espinal, interviene en funciones autónomas como la respiración, digestión, control cardiaco o el equilibrio (Basinger 2021).

De forma auxiliar, el control motor también depende el cerebelo y los ganglios basales. A pesar de no tener un control directo sobre las motoneuronas espinales, presentan conexiones con diferentes núcleos y partes del cerebro y del tronco del

encéfalo. Estas interacciones son capaces de regular el movimiento y el equilibrio, detectando e informando de movimientos erróneos o alteraciones patológicas a las neuronas corticales, desde donde parten las vías descendentes tanto al tronco como a la médula espinal y permiten corregir las acciones motoras rápidamente (Kandel 2013).

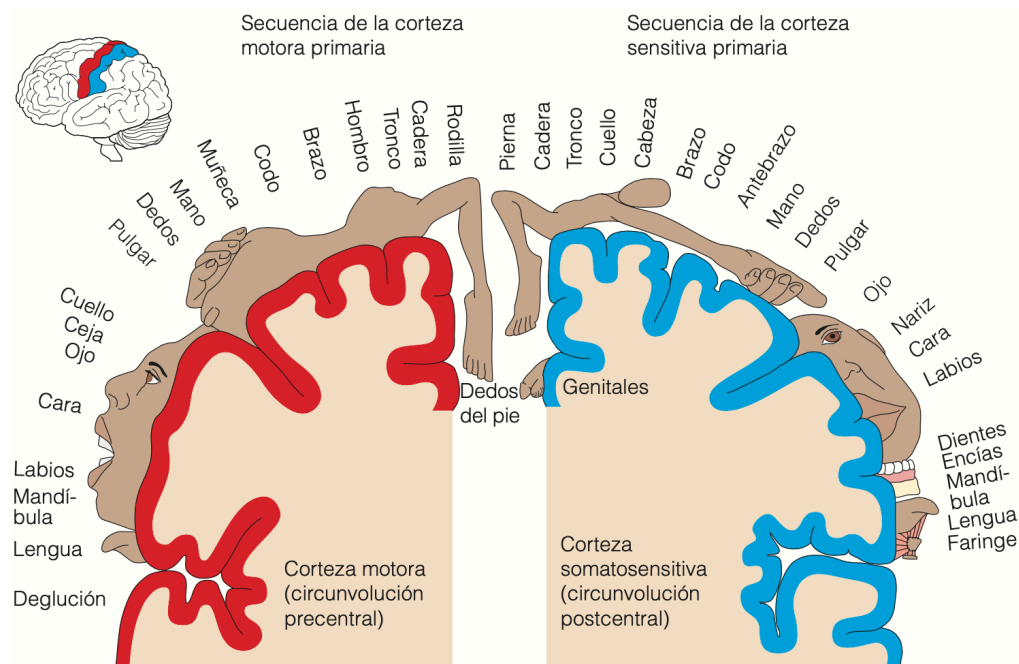


Figura 2. Representación del homúnculo de Penfield, de la corteza motora y sensitiva, responsables de la movilidad y percepción de todas las partes del cuerpo. Copyright © 2009 Pearson Education, Inc, Publishing as Benjamin Cummings.

Del encéfalo parten algunas vías o tractos de comunicación especializados según el tipo de orden que trasladen hacia la médula espinal y el resto del sistema nervioso (Figura 3A). Son agrupaciones de axones de neuronas piramidales de la corteza motora que destacan por su gran longitud y alto grado de mielinización. El tracto corticoespinal, en concreto, la salida más importante de la corteza motora. Desciende por la médula espinal, donde proyecta a diferentes alturas con motoneuronas espinales. Su función principal es trasladar órdenes directas desde la corteza motora a las motoneuronas espinales de movimientos voluntarios detallados y bien diferenciados, especialmente aquellos de los segmentos distales de las extremidades, como son los movimientos finos de la mano y los dedos (Davidoff 1990, Bennet 2003).

La médula espinal se extiende desde la base del cráneo hasta la zona baja lumbar y se aloja en el interior de la columna vertebral. Tiene una forma cilíndrica y es

## INTRODUCCIÓN

simétrica bilateralmente. En corte transversal se observa que tiene una forma parecida a una letra H o forma de mariposa de color más grisáceo, envuelta por una más blanquecina dándole la forma cilíndrica conocida. El color grisáceo se debe a la mayor densidad que supone el alojamiento de los cuerpos neuronales espinales en esta zona interior, mientras que en la zona exterior se encuentran los axones de estas neuronas, y las columnas de los tractos o vías ascendentes y descendentes que transportan los haces motores y sensitivos desde y hacia el encéfalo respectivamente. Su recubrimiento de mielina aporta ese color más blanquecino (Ganapathy 2020).

La distribución de los diferentes tipos de neuronas en la sustancia gris se define en gran parte por los axones de aferencia y eferencia de la médula espinal, por la zona dorsal y ventral respectivamente (Figura 1). En el asta anterior o dorsal se encuentran los axones de las neuronas sensitivas que penetran en la médula por esta zona. Estos axones hacen sinapsis mayoritariamente con interneuronas y minoritariamente con motoneuronas del asta posterior o ventral de la sustancia gris. Los axones de las motoneuronas son eferentes y abandonan la médula espinal por la zona ventral.

Los axones de entrada y salida se agrupan formando fibras a la altura de cada segmento medular, que a su vez son ramificaciones de agrupaciones más grandes y exteriores llamadas raíces, que pueden ser dorsales o ventrales. Estas raíces siguen agrupándose hasta formar los nervios espinales o raquídeos. Las raíces dorsales albergan un ganglio espinal donde se encuentran los cuerpos de las neuronas sensitivas cuyo único axón ramifica en dos direcciones contactando, por un lado, con los receptores periféricos a través del nervio raquídeo, y por el otro, con las interneuronas espinales tras previamente entrar en la médula espinal por la asta dorsal. Las raíces ventrales se componen de las fibras axonales de las motoneuronas espinales que abandonan el parénquima medular (Kandel 2013). Estas raíces se forman para abandonar la columna vertebral, quedando los ganglios protegidos por los pedículos vertebrales.

Bilateralmente, cada raíz dorsal y ventral se unifican en nervios raquídeos o espinales. En su totalidad se forman 31 pares de nervios raquídeos, con correspondencia a los 31 segmentos medulares (8 cervicales C1-C8; 12 torácicos T1-T12; 5 lumbares L1-L5; 5 sacros S1-S5; 1 Coccigeal). Muchos de ellos se

fusionan con sus vecinos formando plexos, cuatro en total. En particular, los nervios provenientes de los segmentos C1-C4 forman el plexo cervical, y lo de los segmentos C5 a T1 forman el plexo braquial (Figura 3B). Los nervios de estos plexos inervan músculos del cuello, hombros, brazos y manos.

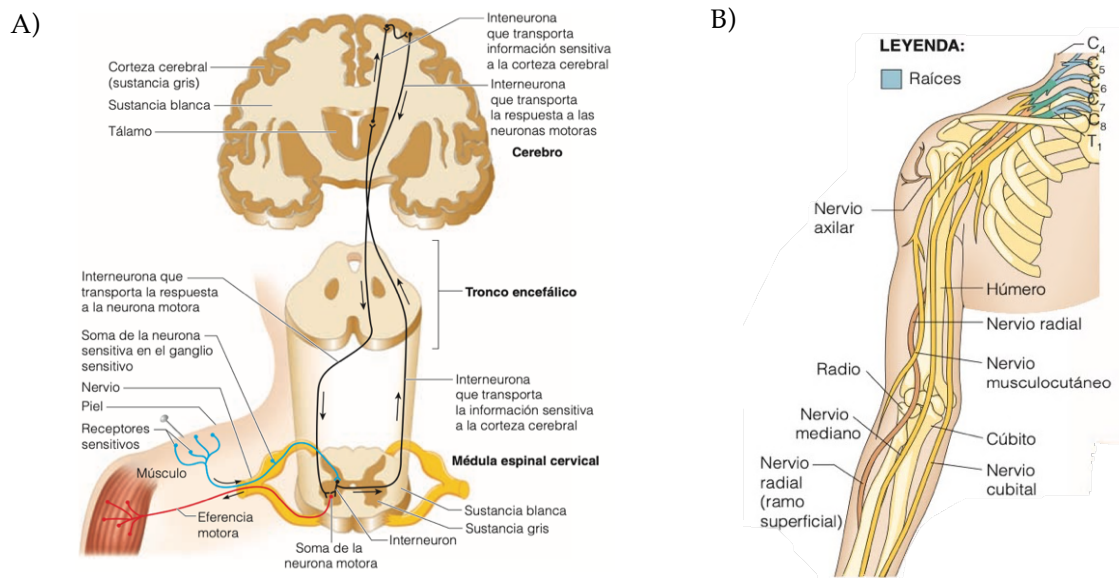


Figura 3. A) Representación de las comunicaciones neuronales, concretamente de las vías ascendentes y descendentes. B) Plexo braquial formado por los nervios raquídeos de las raíces de los segmentos medulares C5-T1 y sus derivaciones nerviosas en la extremidad superior. Copyright © 2009 Pearsons Education, Inc, Publishing as Benjamin Cummings.

De la misma manera que ocurre en el cerebro, la médula espinal posee una representación somatotópica sensorial y motora. Funcionalmente, la médula espinal se divide transversalmente en 31 segmentos medulares, de los que parten 31 pares de nervios raquídeos. Cada segmento medular contiene neuronas que procesan información sensitiva de una zona de la piel e inervan grupos musculares de esta misma zona, definiendo así los dermatomas y miotomas respectivamente (Kaiser 2019). Aunque existen pequeñas variaciones y sus límites puedan ser a veces difusos o estar superpuestos parcialmente, la distribución de dermatomas y miotomas se presenta relativamente igual en todos los individuos (Figura 4). Esta regionalización de la médula y sus innervaciones es de gran utilidad durante la exploración neurológica de lesiones medulares y su alcance, dada la asociación de la altura de la lesión con la pérdida de sensibilidad o funcionalidad en una zona a ese nivel o superior (Snell 2014).





Figura 4 Dermatomas y miotomas. Esquema teórico y su interpretación en individuos dimensiones de los diagramas de miotomas con pintura corporal a partir de Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM (2005) Anatomía de gray para estudiantes. Fuente: <https://hendiportal.com/miotom-i-dermatom/>

## CONTROL MOTOR

En la médula espinal convergen todas las ordenes motoras de los niveles superiores, que son ejecutadas por las motoneuronas y cuyos axones proyectan en las fibras musculares produciendo movimiento. Anteriormente se creía que la medula espinal únicamente era la conexión física entre el encéfalo y los nervios periféricos, quedando relegada su función a conducir señales en forma de impulsos eléctricos desde y hacia el cerebro del resto del cuerpo. Durante las últimas décadas se ha demostrado la existencia de una capacidad adicional de almacenamiento y generación de patrones de movimiento en las regiones subcorticales, tanto en la médula como en el tronco del encéfalo, que pueden activarse con o sin control cortical (Taccola 2018)

En este sentido es importante destacar que existen tres clasificaciones para los movimientos llevados a cabo por el sistema motor: reflejos, rítmicos y voluntarios (Kandel 2013). Los reflejos son respuestas rápidas, involuntarias y estereotipadas a un estímulo sensorial. Según los receptores sensoriales activados, se activan los patrones espaciales y temporales de reclutamiento de diferentes músculos. Se considera que los reflejos son respuestas medulares, ya que todo el procesamiento de la información sensorial y la consecuente respuesta motora ocurre en la

médula espinal sin conexión con estructuras superiores y sin apenas conexiones intermediarias dentro del parénquima medular entre la neurona sensitiva y la motoneurona. Un ejemplo de ello es la retirada de la mano cuando tocamos un objeto caliente o punzante. Sobre los movimientos rítmicos repetitivos, como lo son la marcha o el rascado, se ha demostrado que sus patrones de activación autónomos residen en la médula espinal o tronco del encéfalo, pero por lo general necesitan una orden de inicio de los niveles corticales o, ocasionalmente, por las neuronas sensoriales. Son una combinación entre respuestas reflejas y voluntarias. Los movimientos voluntarios se diferencian por tener un propósito definido, suelen ser más lentos y mejoran con la práctica y con la corrección de errores anteriores. Pueden producirse en respuesta a un estímulo exterior o a un pensamiento, como abrir la puerta tras oír el timbre, leer o tocar el piano.

La mayoría de las conexiones de las aferencias sensitivas o vías descendentes conectan directamente sobre las interneuronas y no sobre las motoneuronas. Un gran número de interneuronas son las que integran y combinan toda la información proveniente del exterior, así como de las estructuras supraespinales antes de finalmente conectar con las motoneuronas del asta anterior y ejecutar el movimiento (Marieb 2008). Esta integración de la información hace pensar en la médula como si fuera una segunda estructura de control que, dependiendo de la información sensorial percibida y el tipo de movimiento posterior, los circuitos neuronales espinales puedan prescindir de un control total por parte del cerebro, y que éste relegue en la médula espinal el control de muchas acciones.

Charles Serrington fue precursor de esta idea en 1906, cuando indicó como unidad básica de movimiento los reflejos simples, que eran movimientos estereotipados originados por información sensorial, y que varios de estos reflejos podían combinarse desencadenando secuencias complejas de movimiento. Ha sido en los últimos años cuando se ha demostrado que estas redes neuronales responsables de movimientos rítmicos, estereotipados y coordinados podían incluso activarse y mantenerse, independientemente de aferencias sensitivas (Gerasimenko 2015b). Estas redes o circuitos de interneuronas en la médula espinal son conocidos como centros generadores de patrones de movimientos o CPG por sus siglas en inglés (*central pattern generator*) (MacKay-Lyons 2002, Guertin 2013, Minassian 2017). Pueden ser modulados por aferencias sensoriales u órdenes supraespinales. Queda mucho aún por conocer en cuanto a la relación

## INTRODUCCIÓN

entre neuronas e interneuronas de la médula espinal y su planificación en este tipo de agrupaciones. Los primeros estudios revelan fases de excitación e inhibición por parte de estas interneuronas con las motoneuronas para alternar músculos, como pueden ser los flexores y los extensores, generando movimientos rítmicos (Kiehn 2006).

Por ejemplo, desde un punto de vista de control motor, se ha demostrado que existe a nivel lumbar un centro o agrupación neuronal responsable de la coordinación de las piernas durante la locomoción o cuando se practica natación (Dimitrijevic 1998, Guertin 2013). Mientras se camina, apenas hay consciencia de la coordinación motora que se desarrolla o de los complejos patrones musculares necesarios para ello, exceptuando quizás cuando se debe adaptar para esquivar a alguien o algún obstáculo en el suelo. Similares movimientos automáticos, inconscientes y muy parecidos entre individuos han llamado la atención de investigadores durante los últimos años, para estudiar la posible existencia de otro generador de patrón de movimiento a nivel cervical, que origine una coordinación de brazo y mano de forma tan estereotipada como por ejemplo el hecho de alimentarse.

En el caso de la locomoción cuadrúpeda, existe un alto grado de coordinación entre las extremidades delanteras y traseras, debido a la actividad rítmica generada por circuitos neuronales situados a nivel lumbar y cervical respectivamente que están conectado por largos axones propioespinales. (Duysens 1998, Miller 1975). La locomoción bípeda característica de la especie humana es una evolución desde la locomoción cuadrúpeda. La mantenida alta coordinación del balanceo de los brazos y las piernas en los humanos durante la locomoción permite pensar que estos circuitos neuronales especializados y conexiones se han mantenido en la evolución filogenética. Estos estarían coexistiendo con nuevos circuitos desarrollados para el control fino de las manos y extremidades superiores. En el control de estos circuitos cervicales responsables de las extremidades superiores intervienen dos vías, las vías propioespinales evolutivamente mantenidas y residuales de la locomoción, y una fuerte conexión vía tracto corticoespinal cuya evolución y presencia está muy relacionada con la ganancia de destreza manual de las especies (Revisado en Dietz 2002). Ambas vías coexisten durante el control motor de las extremidades superiores dependiendo de la tarea desempeñada. De forma simplificada, durante la

locomoción las conexiones corticoespinales estarían inhibidas mientras las interneuronas se encargarían de procesar las intenciones corticales y coordinar mediante los sistemas propioespinales los movimientos de brazos y piernas. En el caso de los movimiento finos de las manos, todo este sistema anterior se encontraría inhibido, permitiendo mientras un control absoluto de los circuitos espinales por parte de los tractos corticoespinales (Figura 5).

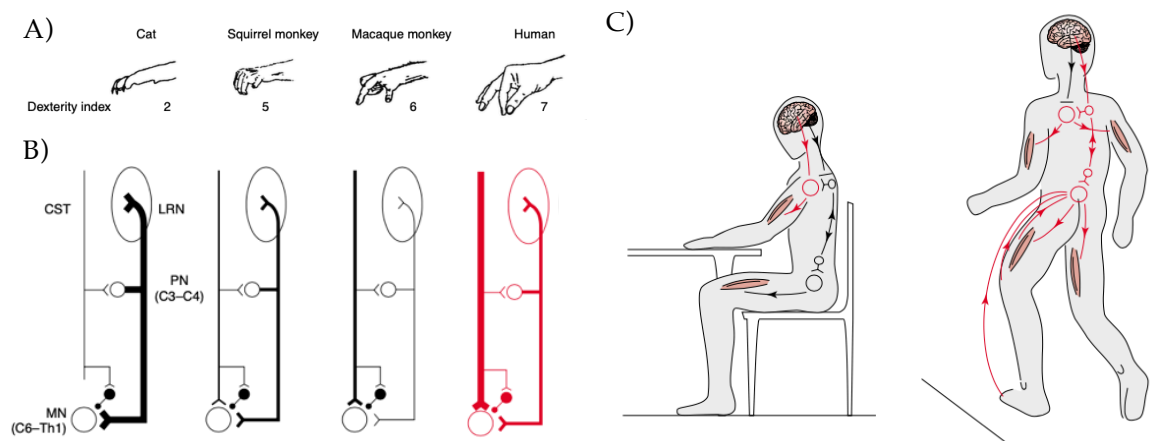


Figura 5: Control motor de las extremidades superiores. A) Índice de destreza manual de gatos, monos macacos y humanos. B) Diagrama del posible de las estructuras que de control neural de las extremidades superiores (C3-C4) e inferiores (C6-Th1) de estas especies. El sistema propioespinal (PN) reduce su contribución a lo largo de las especies, mientras se fortalece el tracto corticoespinal (CST). A pesar de esta evolución, las conexiones del sistema propioespinal se mantienen activas en paralelo al reforzado tracto cortiespinal durante la activación de la motoneuronas (MN) responsables de la locomoción ; LRN: núcleo reticular lateral (tronco del encéfalo). C) Control del movimiento de las extremidades superiores según la tarea que se desarrolle. Durante movimientos manuales (izquierda) se produce una fuerte activación (rojo) de las vías directas entre la corteza y las motoneuronas cervicales, mientras que el sistema propioespinal cervical se encuentra inhibido (negro). Durante la locomoción, el cerebro se comunica directamente con las interneuronas, activando los sistemas propioespinal cervicales y lumbares que controlan coordinadamente el movimiento de las extremidades. Las vías directas de conexión entre el cerebro y las motoneuronas cervicales se encuentran inhibidas (negro). Extraído y adaptado de Dietz 2002

Estudios recientes han corroborado la conexión de entre ambos circuitos mediante estimulación de estos centros cervicales con mejoras funcionales en las extremidades inferiores (Gerasimenko 2015a, Parhizi 2021, Le Gal 2019, Inanci 2018, 2021).

En esta tesis es de nuestro interés saber más sobre los circuitos neuronales medulares, en concreto a nivel cervical, y que puedan ser responsables de movimientos estereotipados de las extremidades superiores.

## LESIÓN MEDULAR

La médula espinal es susceptible de sufrir lesiones, ya sea por enfermedades causadas por factores internos (neurodegeneración, inflamación, tumores, etc.) o

## INTRODUCCIÓN

por factores externos como son los traumatismos. Todas las lesiones medulares tienen como consecuencia alteraciones en el control motor o sensibilidades en diferentes zonas del cuerpo. En el caso de los traumatismos, se produce una compresión excesiva de zonas de la médula espinal generando muerte neuronal e interrupción de vías ascendentes y/o descendentes, privando de comunicación al encéfalo con muchas partes del cuerpo. Los axones de estas vías ascendentes y descendentes quedan dañados y pueden provocar incluso también la muerte de las neuronas corticales asociadas. Por lo general estas lesiones en humanos son anatómicamente incompletas, quedando parte del tejido subyacente preservado, pero puede ser funcionalmente incompleta o completa según sea el grado de interrupción del flujo de información con el encéfalo. Es por esta razón que la pérdida de control y sensibilidad se produzca de forma parcial o total en los músculos inervados por segmentos medulares que queden por debajo de la lesión. Como consecuencia los pacientes sufren tetraplejia, resultado de una paralización de las extremidades inferiores por una lesión a niveles torácico-lumbar; o paraplejia, una paralización de la extremidades inferiores y superiores al producirse una lesión grave a nivel cervical. Los pacientes que sufren una lesión incompleta suelen presentar mejor capacidad de recuperación tras la lesión que las lesiones completas (Revisado en Courtine 2019, Rossignol 2011).

Cuando se produce una lesión medular y con ello la muerte celular de las neuronas, el sistema inmunitario se activa. Una mezcla de tejido fibrótico, conectivo y mesenquimal quedan rellenando la zona de muerte neuronal formando una cavidad cística envuelta por una capa de astrocitos gliales que generan una densa cicatriz. Esta cicatriz supone una barrera mecánica, para la regeneración de axones a través de la zona de la lesión. La zona colindante a la lesión queda muy dañada para potenciar una regeneración de axones restaurando la anatomía original, pero aún después de la lesión el sistema en muchos casos mantiene su capacidad plástica y se producen algunos crecimientos axonales (Courtine 2019). El problema subyace en que muchas de esas nuevas conexiones son con neuronas incorrectas o producen conexiones aberrantes (Beuparlant 2013). La rehabilitación ayuda a orientar y reconvertir estas conexiones para que sean funcionales, como crear nuevas sinapsis o potenciar aquellas que son más adecuadas (Jiang 2016). Además de la propia plasticidad del sistema existen varias estrategias que promueven la recuperación de la actividad medular. Estas

estrategias tienen varios abordajes, desde intentar desbloquear la regeneración axonal con farmacología, introducir células madre en la cavidad cística o modular de forma interna o externa la médula espinal para ayudar a devolver la funcionalidad al tejido remanente que ha quedado silenciado (Courtine 2019).

La homeostasis es la capacidad del cuerpo humano de mantener unas condiciones internas estables, en un equilibrio dinámico según los constantes cambios internos y externos. Es el resultado de comunicación e interrelación entre todos los sistemas del cuerpo, que permiten cubrir las necesidades y funcionamiento del cuerpo humano sin contratiempos. Durante el envejecimiento, los órganos y sistemas presentan deficiencias que se traducen en desequilibrios homeostáticos. Tras una lesión medular también ocurren estos desequilibrios homeostáticos. La interrupción de las comunicaciones del sistema nervioso a nivel medular con mayor o menor intensidad con el resto de sistema provoca un desequilibrio homeostático. Las consecuencias más visibles pueden ser la pérdida de sensibilidad e inmovilidad en regiones situadas por debajo de la lesión o bien la aparición de espasticidad en los músculos afectados, por una retro-activación constante y aberrante de los circuitos medulares que producen contracciones involuntarias e incontrolados de músculos por debajo de la lesión (Marieb 2008).

## **TERAPIAS**

Tras una lesión medular, muchos de los circuitos sensomotores de la médula espinal ven alteradas sus vías de comunicación con los niveles supraespinales y estos circuitos se vuelven disfuncionales (Courtine 2009). En los últimos años se ha avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos celulares que tienen lugar tras una lesión medular, en concreto la capacidad plástica del sistema nervioso y su capacidad de recuperación de forma espontánea y potenciada por otras técnicas. Tras la muerte de neuronas, la capacidad plástica del sistema permite a otras neuronas remanentes crear nuevas sinapsis que puedan, aún por otras vías, reestablecer la funcionalidad perdida. Esta reorganización espontánea de los circuitos neuronales se ha observado tanto en daños cerebrales (Overman 2014) como en lesiones medulares incompletas (van der brand 2012, Murray 2010, Bareyre 2004, , Rosenzweig 2010, Courtine 2008, Baker 2017).

## INTRODUCCIÓN

Además de los abordajes intrínsecos del propio cuerpo humano, existen varios abordajes externos para ayudar al sistema a una mayor recuperación. Se concentran principalmente en cinco modalidades: (1) farmacología para la neuroprotección del tejido; (2) farmacología para la regeneración del tejido dañado; (3) introducción de células madre o diferenciadas; (4) dispositivos externos protésicos; y (5) la neuromodulación.

Durante años se ha estudiado la farmacología asociada a la activación o inhibición de mecanismos que ayuden a proteger el tejido colindante a la lesión de la inflamación y apoptosis, entre los que se incluyen el metilprednisolona, riluzole y minociclina; así como potenciar la regeneración del tejido axonal mediante inhibidores de los receptores Rho y Nogo (Wilson 2013). A pesar de los múltiples estudios, muchos aún se encuentran en fase de estudios clínicos y no hay evidencias de mejoras sustanciales probadas (Shah 2020).

La introducción de células madre o células ya diferenciadas en la zona de la lesión promueven la regeneración axonal y remielinización (Fawcett 2018, Jin 2019, Fischer 2020). Con ello se contribuye a la creación de nuevas conexiones para reestablecer las comunicaciones interrumpidas. Aún su difícil estudio in vivo, muchos estudios muestran avances, (Rosenzweig 2018, Lu 2012, Kadoya 2016), incluso con la ayuda de biomateriales (Gao 2013, O'shea 2017), aunque aún queda un largo camino de investigación en ensayos clínicos. Las cuestiones éticas y legales derivadas del uso de células madre están también bajo estudio.

El uso de los dispositivos protésicos ha aumentado considerablemente en los últimos años y se han vuelto habituales en los programas de rehabilitación actualmente. Los exoesqueletos robóticos permiten a los pacientes con lesión medular movilizar sus extremidades de forma totalmente pasiva o parcialmente activa, según ofrezcan o no resistencia motora. Con ellos no solo se estimula el sistema nervioso y muscular, sino también se mejora el sistema cardiovascular de los pacientes debido al equilibrio homeostático (Gassert 2018). Los estudios realizados hasta el momento permiten evidenciar mejoras en estos y otros aspectos fisiológicos y psicológicos que mejoran la calidad de vida de los pacientes (Gorgey 2018, Donati 2016). El entrenamiento de la locomoción en pacientes sujetos mediante un arnés vertical con exoesqueletos sobre una cinta rodante ha mejorado los parámetros de la marcha, consiguiendo reducir en las

sesiones posteriores el aporte asistido del propio exoesqueleto (Grasmucke 2017, Nam 2017). La rehabilitación con dispositivos protésicos ha demostrado mejorar la funcionalidad motora del paciente y sus niveles de actividad física (Gorgey 2018, Jung 2019).

Respecto al último abordaje de las terapias rehabilitadoras, la neuromodulación, dada la importancia que tiene para esta tesis, se presenta de forma más extendida en el siguiente subcapítulo.

Previamente caben destacar las novedosas y complejas interfaces cerebro-máquina o *brain-machine interfaces (BCIs)* en inglés. Utilizan novedosas tecnologías y algoritmos informáticos para decodificar las señales cerebrales en órdenes motoras que se trasladan a un dispositivo ejecutor. Si el grado de lesión lo permite y los músculos no están denervados, primero se intenta reactivar la propia fisiología para realizar el movimiento. En caso contrario, esta señal se transmite a un robot que lo ejecuta en su lugar. Estas interacciones entre el sistema nervioso y la informática presentan nuevas soluciones que permiten puentear las conexiones de comunicación cuando han perdido su total funcionalidad (Capagroso 2016, Bonizzato 2018, Ajiboye 2017, Bouton 2016, Donati 2016).

## NEUROMODULACIÓN

La neuromodulación es una modalidad terapéutica que pretende, mediante estimulación eléctrica, magnética o farmacológica, alterar la actividad neuronal del tejido preservado aumentando su nivel de excitabilidad y/o propiciando cambios plásticos que permitan nuevas interconexiones, la reorganización de los circuitos preservados y mejorar la conectividad de la zona y la capacidad de recuperación motora (van den Brand 2012).

Estas estimulaciones se aplican en el cerebro o en la médula. En el caso del cerebro, las técnicas más utilizadas son la estimulación magnética transcraneal repetida (EMTr) y la estimulación transcraneal con corriente directa (tDCs), ambas técnicas no invasivas. En el caso de la primera, mediante una bobina apoyada en el cráneo se genera un campo magnético que estimula sobretodo neuronas corticales superficiales de la corteza motora. Mediante electromiografía y gracias a la distribución topográfica de la corteza motora y la médula espinal, es posible evaluar el alcance de la lesión. Los potenciales evocados a nivel



## INTRODUCCIÓN

muscular por la estimulación dejando ser observados pasada la altura de la lesión donde se ha visto interrumpida la comunicación del tracto corticoespinal con las motoneuronas. Según los parámetros de estimulación se puede regular que la estimulación produzca un aumento o reducción de la excitabilidad de estas neuronas y promover su plasticidad para una recuperación de la función motora (Monte Silva 2013, Karabanov 2016). La estimulación transcraneal con corriente directa consiste en la aplicación de corriente a través del cuero cabelludo entre dos electrodos con diferente polaridad (ánodo y cátodo). Mediante su aplicación se pretende producir cambios en la tasa de disparo de las neuronas cerebrales modificando su excitabilidad de membrana celular (Nitsche 2007, Lang 2005). Según la polaridad o la dirección de la corriente aplicada, se producen despolarizaciones o hiperpolarizaciones de membrana, que aumentan o disminuyen la excitabilidad cortical. Con ello se pretende provocar la potenciación o depresión de sinapsis corticales (Jamil 2017, Lang 2004).

La neuromodulación farmacológica se basa en medicamentos monoaminérgicos que consiguen mejoras motoras tras una lesión medular (Radharishna 2017, Gerasimenko 2015c, Courtine 2009, Jin 2021) al potenciar o inhibir diferentes actores celulares.

La neuromodulación mediante estímulos eléctricos ha permitido recuperar actividad motora en músculos inervados por segmentos espinales que se sitúan por debajo de una lesión medular. Se ha evidenciado que provoca un incremento de excitabilidad y respuesta en redes neuronales motoras (Dimitrijevic 1998, MacKay-Lyon 2002, Zareen 2017) y/o a las conexiones espinales y supraespinales preservadas con estos grupos de neuronas (Taccola 2018). Su aplicación sobre la médula espinal puede ser invasiva o no invasiva, según sea epidural o transcutánea (Courtine 2019). La neuromodulación eléctrica medular se basa en la despolarización de las fibras propioceptivas que llegan a la raíz dorsal, que acceden al parénquima medular activando interneuronas y/o motoneuronas asociadas a la innervación de las raíces de ese segmento espinal (Capagrosso 2013, Gerasimenko 2015b). Existe también otra forma de aplicación como la micro estimulación intraespinal (Holinski 2016, Kasten 2013) o subdural (Minev 2015), aunque aún se encuentran en experimentación.

La estimulación eléctrica epidural requiere la implantación quirúrgica de una red de electrodos de alta densidad en el espacio epidural dorsal, sobre la duramadre. Permite una estimulación espaciotemporal de zonas medulares concretas (Wagner 2018). A nivel lumbar, se ha demostrado la capacidad de esta estimulación de activar la red neural responsable de la marcha, que permite devolver a los pacientes la posibilidad de dar pasos en mayor o menor medida (Harkema 2011, Van der Brand 2012, Angeli 2014, Minassian 2016, Danner 2015, Wagner 2018, Gill 2018, Formento 2018). A nivel cervical, es menor el número de estudios realizados, aunque suficientes para evidenciar avances en la funcionalidad de grupos musculares inactivos tras una lesión medular (Lu 2016). Mediante la estimulación epidural se pudieron volver a observar movimientos voluntarios de las extremidades paralizadas por la lesión, así como reducción de la consecuente espasticidad en muchos casos (Harkema 2011, Angeli 2014).

La aplicación de los estímulos eléctricos de forma transcutánea mediante electrodos adhesivos sobre la piel, ha permitido obtener respuestas reflejas muy similares a las obtenidas mediante la estimulación epidural, evidenciando que ambas activaban estructuras neuronales comunes (Minassian 2007, Hofstoetter 2008, 2018). La estimulación transcutánea consiste en aplicar la corriente a través de electrodos de superficie autoadhesivos, el cátodo a la altura del segmento medular de interés y el ánodo, como electrodo de referencia, en el abdomen o sobre las crestas ilíacas. Se han realizado numerosos estudios que evidencian su seguridad y su capacidad de mejora funcional de la estimulación eléctrica transcutánea tanto a nivel lumbar (Hofstoetter 2015, Minassian 2016, Gerasimenko 2015b, 2015c, 2018) como a nivel cervical (Murray 2017, Gad 2018, Freyvert 2018, Inanci 2018, Benavides 2020, Kumru 2021a, Inanci 2021, Wu 2020).

La aplicación de la neuromodulación se ha combinado con entrenamiento funcional por parte del paciente y/o con farmacología (Gerasimenko 2015b, 2015c, Gad 2018, Freyvert 2018, Kumru 2021a, 2021b). En el caso del entrenamiento o movimientos voluntarios, es recomendable dado la plasticidad dependiente de actividad física asociada a los circuitos preservados y las conexiones residuales que revierten en mejoras funcionales (Raineteau 2001, Edgerton 2004, Côté 2017, Harkema 2008). Esta intención de movimiento guía los impulsos nerviosos evitando así conexiones aberrantes en la regeneración espontánea degradando la funcionalidad de la zona (Dietz 2010, Bilchak 2021). De la misma manera es

## INTRODUCCIÓN

importante mantener las vías sensitivas activas, ya que son las precursoras del inicio de muchos movimientos que ayudan, junto con el resto de las terapias, a reforzar el conectoma espinal (sistema propioespinal). En paralelo, la neuromodulación también ayuda a recuperar la funcionalidad de las vías sensitivas que aportan información del exterior y que modula la respuesta motora según las necesidades ambientales (van den Brand 2012).

A pesar de los prometedores resultados funcionales visibles, sigue siendo difícil explicar los mecanismos celulares que la estimulación eléctrica provoca en la médula espinal. Varios investigadores han estudiado sobre las posibles vías y estructuras activadas durante la estimulación eléctrica (Gerasimenko 2015b, 2015c). Además se han realizado simulaciones computacionales sobre la difusión teórica de la corriente eléctrica en los tejidos y la profundidad que pueda alcanzar, ayudando así a discernir el papel que puedan tener las diferentes estructuras neurales espinales (Greiner 2021, Capagrosso 2013, ladenbauer 2010, Danner 2011, 2014).

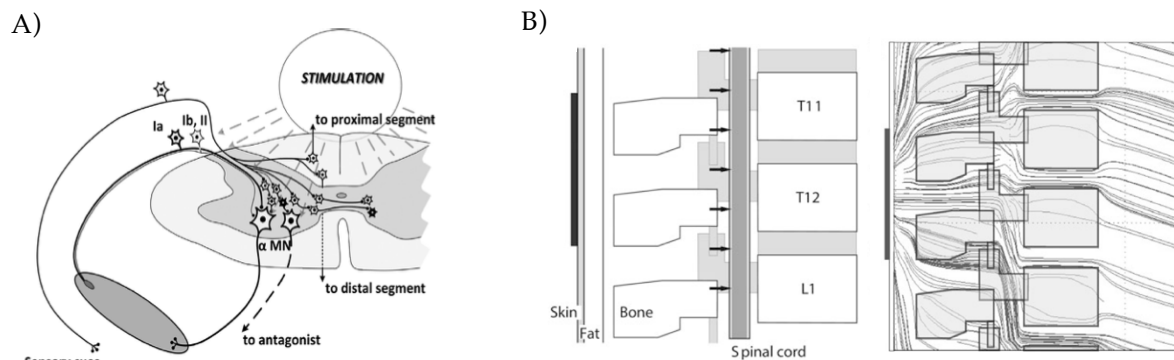


Figura 6: A) Propuesta de las vías y estructuras que se activan bajo la estimulación eléctrica medular, donde las motoneuronas alfa (MN), pueden ser activadas directamente por la estimulación o la previa activación de las neuronas sensitivas aferentes (Ia, Ib, I) (Extraído de Gerasimenko 2015b). B) Modelo geométrico de elementos finitos que muestra en corte sagital los tejidos y estructuras alrededor de la médula espinal (izquierda) y la seguida simulación del flujo de corriente desde el electrodo transcutánea (rectángulo negro) (Extraído de Danner 2014).

Por lo general, los autores se refieren a esta terapia como estimulación transcutánea de la médula espinal (en inglés, *transcutaneous spinal cord stimulation*; tSCS). Algunos autores han distinguido la estimulación aplicada como facilitación eléctrica para el control motor (en inglés, *electrical Enabling motor control eEmc*). Su intención es dejar claro el papel de esta estimulación como facilitadora del movimiento y el control motor voluntario sin inducir una activación directa e involuntaria de los músculos. Tras una lesión medular el umbral de excitabilidad

de las neuronas es menor (Ghran 2017). La aplicación de corriente eléctrica revierte esta situación, aumentando el umbral de excitabilidad de las redes neuronales espinales, sin llegar a superarlo en ningún momento en el caso de la intención de facilitar el movimiento voluntario y no activar involuntariamente el músculo. El estado fisiológico de los circuitos espinales cambia, volviéndose receptivos y sensibles a la información recibida tanto por vías propioceptivas como por las vías descendentes supraespinales. Se reserva así la activación final de los músculos a la voluntad del individuo (Hofstoetter 2013, Gerasimenko 2015c, Taccola 2018, Sayenko 2019, Kumru 2021a, 2021b).



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

En el control motor de un movimiento participan diferentes estructuras neurales distribuidas a lo largo del todo el sistema nervioso. Estudios experimentales, sobre todo con roedores y felinos espinalizados, han mostrado que la médula espinal posee circuitos capaces de procesar y ejecutar un movimiento con independencia de orden cortical, otorgando a la médula espinal un rol funcional que excede del papel puramente receptor y ejecutor de señales descendentes. La presencia de circuitos medulares, son una diana terapéutica, ya que su modulación y activación provoca la activación de movimientos complejos, como la locomoción. Recientemente la estimulación de la médula lumbar ha permitido la recuperación del control voluntario de la postura y deambulación en pacientes con paraplejia.

Aun siendo la estructura anatómica de la médula cervical y lumbar parecida, la fisiología de los movimientos que controlan puede ser dispar. Mientras que está bien descrito el papel preponderante que los circuitos reflejos tienen en la locomoción, se desconoce la función y excitabilidad de los circuitos cervicales para procesar y ejecutar movimientos de los brazo y manos, que requieren de un alto grado de destreza.

En la presente tesis se hipotetiza que la médula espinal cervical alberga circuitos encargados del control fino de las extremidades superiores, y que por tanto son susceptibles a la modulación eléctrica, para aumentar su excitabilidad y eficiencia facilitando el movimiento. En la presente tesis se estudia el control motor de roedores para alcanzar y agarrar objetos, con el fin de evaluar la consistencia y variabilidad del reclutamiento de la musculatura motora, y la susceptibilidad de la médula cervical en humanos sanos de ser neuromodulada por estimulación eléctrica transcraneal.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La tesis presenta los siguientes objetivos generales.

- Evidenciar en sujetos sanos que la estimulación eléctrica transcutánea sobre la médula espinal cervical incide y modifica la excitabilidad y función de los circuitos cortico-medulares y evaluar si esta neuromodulación requiere, o no, de la actividad simultánea de la musculatura de los brazos a la estimulación.
- Determinar el grado de intensidad de estimulación y de la actividad muscular óptimas para neuromodular las circuitería cortico-medular de sujetos sanos.
- Analizar el patrón de actividad muscular de las extremidades superiores de roedores sanos cuando realizan movimientos de alcance y agarre.







## PUBLICACIÓN 1

---

La estimulación eléctrica epidural (Harkema 2011, Wagner 2018, Lu 2017) y su evolución hacia aplicaciones no invasivas de forma transcutánea (Gerasimenko 2015c, Inanici 2018) ha resultado tener la capacidad de ayudar en la recuperación funcional de las extremidades en pacientes parapléjicos y tetrapléjicos tras una lesión medular. La hipótesis subyace en la existencia de redes neuronales espinales sensitivas y motoras que, tras quedar parcialmente dañadas tras una lesión medular incompleta y gracias a la neuromodulación, puedan elevar su estado funcional facilitando así la transmisión de los impulsos y la recuperación del control motor voluntario sobre los músculos (Gad 2018, Freyvert 2018).

Con el objetivo de esgrimir los efectos de ambos estímulos y mejorar el diseño de las futuras terapias, se propone el siguiente estudio que evalúa los posibles beneficios funcionales y neurofisiológicos que provocan la actividad física y la estimulación eléctrica transcutánea de forma individual y combinada en sujetos sanos.





La combinación de estimulación eléctrica y actividad mostraron mejores resultados en la fuerza de agarre manual, la excitabilidad espinal y corticoespinal respecto a la aplicación de estos estímulos de forma independiente. Estos efectos se observaron después de su aplicación e incluso una hora después.

Los resultados sugieren cambios plásticos inducidos a nivel espinal y probablemente a nivel cortical a corto plazo con una única sesión. Posiblemente una exposición mantenida a ambos estímulos pueda producir cambios a largo plazo. La naturaleza de una lesión medular incompleta tiene presente la preservación de parte de tejido vivo aunque, por lo general, no funcional. Con cautela, y a falta de replicación de este tipo de estudios con pacientes, es posible pensar en ellos como beneficiarios de estos cambios plásticos asociada a la neuromodulación en la zona de lesión que ayude a recuperar parcialmente la función motora y reestablecer la comunicación cerebro-espinal.



## Article

# Cervical Electrical Neuromodulation Effectively Enhances Hand Motor Output in Healthy Subjects by Engaging a Use-Dependent Intervention

Hatice Kumru<sup>1,2,3,\*</sup>, África Flores<sup>4</sup>, María Rodríguez-Cañón<sup>4</sup>, Victor R. Edgerton<sup>1,5</sup>, Loreto García<sup>1,2,3</sup>, Jesús Benito-Penalva<sup>1,2,3</sup>, Xavier Navarro<sup>1,4</sup>, Yury Gerasimenko<sup>6,7</sup>, Guillermo García-Alías<sup>1,4</sup> and Joan Vidal<sup>1,2,3</sup>

- <sup>1</sup> Fundació Institut Guttmann, Institut Universitari de Neurorehabilitació Adscrit a la Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain; vre@ucla.edu (V.R.E.); loretogarcia@guttmann.com (L.G.); jbenito@guttmann.com (J.B.-P.); xavier.navarro@uab.cat (X.N.); guillermo284@gmail.com (G.G.-A.); jvidal@guttmann.com (J.V.)
- <sup>2</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain
- <sup>3</sup> Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain
- <sup>4</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia & Insitute of Neuroscience, Universitat Autònoma de Barcelona, and CIBERNED, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; africa.flores@uab.cat (Á.F.); rodriguezcanonmaria@gmail.com (M.R.-C.)
- <sup>5</sup> Department of Integrative Biology and Physiology, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA
- <sup>6</sup> Pavlov Institute of Physiology, 199034 St. Petersburg, Russia; yuryg@ucla.edu
- <sup>7</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Louisville, Louisville, KY 40292, USA
- \* Correspondence: hkumru@guttmann.com; Tel.: +34-934-977-700



**Citation:** Kumru, H.; Flores, Á.; Rodríguez-Cañón, M.; Edgerton, V.R.; García, L.; Benito-Penalva, J.; Navarro, X.; Gerasimenko, Y.; García-Alías, G.; Vidal, J. et al. Cervical Electrical Neuromodulation Effectively Enhances Hand Motor Output in Healthy Subjects by Engaging a Use-Dependent Intervention. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 195. <https://doi.org/10.3390/jcm10020195>

Received: 12 December 2020

Accepted: 5 January 2021

Published: 7 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Electrical enabling motor control (eEmc) through transcutaneous spinal cord stimulation is a non-invasive method that can modify the functional state of the sensory-motor system. We hypothesize that eEmc delivery, together with hand training, improves hand function in healthy subjects more than either intervention alone by inducing plastic changes at spinal and cortical levels. Ten voluntary participants were included in the following three interventions: (i) hand grip training, (ii) eEmc, and (iii) eEmc with hand training. Functional evaluation included the box and blocks test (BBT) and hand grip maximum voluntary contraction (MVC), spinal and cortical motor evoked potential (sMEP and cMEP), and resting motor thresholds (RMT), short interval intracortical inhibition (SICI), and F wave in the abductor pollicis brevis muscle. eEmc combined with hand training retained MVC and increased F wave amplitude and persistency, reduced cortical RMT and facilitated cMEP amplitude. In contrast, eEmc alone only increased F wave amplitude, whereas hand training alone reduced MVC and increased cortical RMT and SICI. In conclusion, eEmc combined with hand grip training enhanced hand motor output and induced plastic changes at spinal and cortical level in healthy subjects when compared to either intervention alone. These data suggest that electrical neuromodulation changes spinal and, perhaps, supraspinal networks to a more malleable state, while a concomitant use-dependent mechanism drives these networks to a higher functional state.

**Keywords:** transcutaneous spinal cord stimulation; hand training; combined intervention; neuromodulation; cervical spinal cord

## 1. Introduction

Electrical stimulation of the spinal cord is an emerging valuable tool in clinical practice for facilitating the recovery of sensory and motor function in subjects with spinal cord injury (SCI) [1]. Outstanding clinical achievements have been recently reported showing that lumbar epidural stimulation facilitates the recovery of posture, stepping, and voluntary control of the lower limbs in subjects with chronic SCI [2–6]. Cervical epidural

stimulation increased hand grip force and hand volitional control in tetraplegic patients [7]. On the other hand, recently developed non-invasive transcutaneous electrical spinal cord stimulation (electrical enabling motor control, eEmc) has demonstrated its efficacy to improve lower limb motor function after paralysis [8–10], as well as hand grip strength and voluntary control in tetraplegic patients [11–14]. In both stimulation conditions, the underlying hypothesis states that the spinal sensory–motor networks above, within, and below the lesion are neuromodulated and raised into an elevated functional state that enables and amplifies voluntary motor control [11–14]. In the context of SCI rehabilitation, the term eEmc [8–10] emphasizes and distinguishes this technique from other transcutaneous electrical stimulation approaches that directly induce muscular contraction, instead of facilitating and enabling voluntary control.

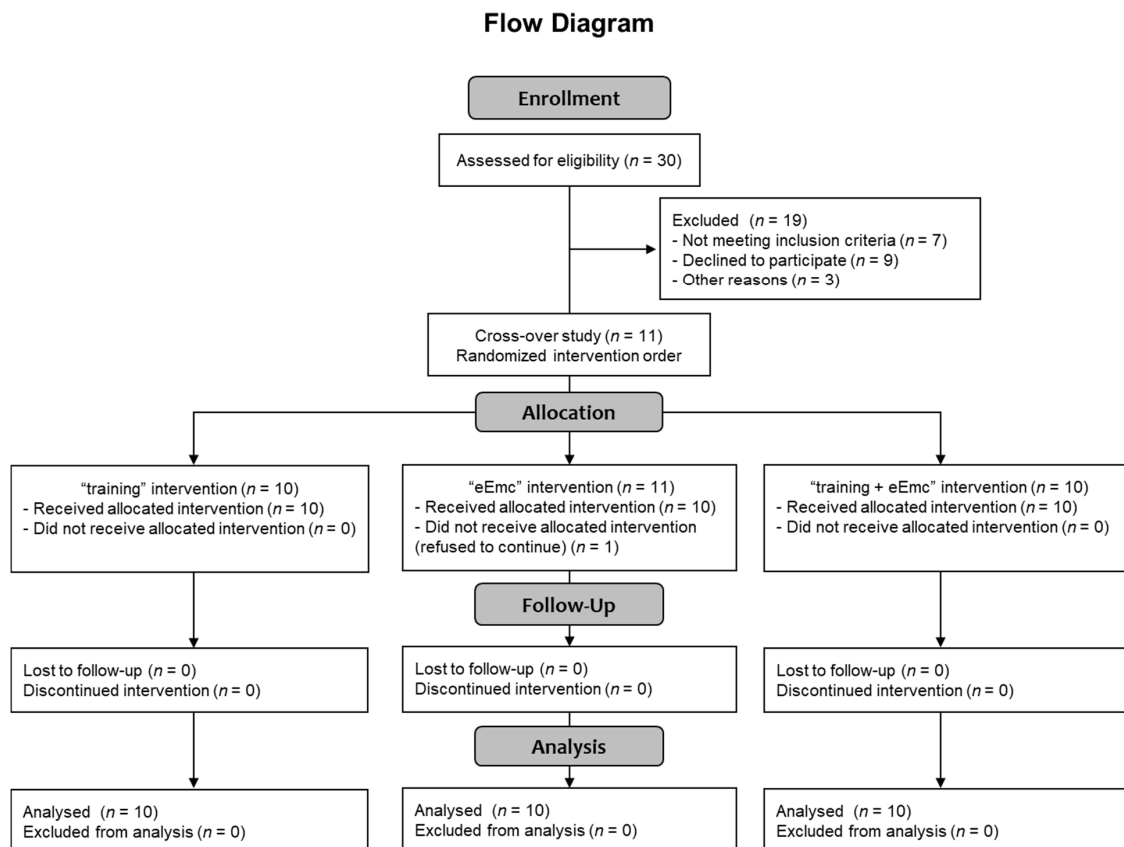
Since transcutaneous spinal cord stimulation (tSCS) is a non-invasive and safe method, it can be easily applied in healthy subjects and can also be employed to unravel the neurophysiological mechanisms acting on sensory and motor recovery in individuals suffering from SCI [12]. By applying high-frequency trains of stimuli (i.e., eEmc) to the thoracolumbar segments, locomotor-related neuronal networks can be neuromodulated to physiological states that enable the generation of bilateral rhythmic step-like movements with the legs placed in a gravity-neutral position in non-injured subjects [15] and in spinally injured subjects categorized as a complete SCI (ASIA A) [16]. One of the mechanisms considered to be important in that movement is mediated by activation of the spinal central pattern generators of locomotion [17]. The degree to which this specific mechanism contributes to upper limb movements, however, remains unclear, since it may act together with other adaptations to allow the recovery of a wide range of movements that are not predominantly repetitive, such as stepping. Importantly, continuous eEmc delivery also improves hand motor performance after one single exposure from 20 min to 2 h in SCI patients [11–14]. A recent work reveals that high-frequency eEmc induces plastic changes on neuronal circuits controlling upper limb function also in intact subjects [14].

Activity-dependent plasticity is the key phenomenon thought to underlie functional recovery observed after both physical activity and stimulation-based rehabilitative approaches in SCI [18–20]. However, the mechanisms recruited by physical training and by electrical stimulation, although partially overlapping, may involve different and perhaps synergistic processes leading to more effective neural circuit reorganization. However, reported studies do not address whether eEmc applied alone or together with hand training showed better clinical or neurophysiological effects in SCI patients. Indeed, the majority of the studies only applied eEmc combined with hand training [9,10,12,13]. More studies are needed to directly assess the role of use-dependent mechanisms in an attempt to optimize therapeutic efficacy of stimulation approaches and training. Here we hypothesized that the application of eEmc together with hand grip training can increase hand motor output more than either of the two interventions alone. We further hypothesized that the improved function would be the result of a synergistic reorganization of both spinal and supraspinal networks that could enable the performance of the neuromuscular unit being engaged. To answer these questions, each participant was subjected to a hand motor functional and neurophysiological assessment before and after each of three interventions (training, eEmc, and training + eEmc). To detect hand muscle strength and a manual dexterity, we used the hand grip maximum voluntary contraction (MVC) and the box and blocks test (BBT). Spinal cord excitability was assessed by F wave and by recruitment curves of spinal motor evoked potentials (sMEPs) in hand and arm muscles induced by single-pulse tSCS. Corticospinal excitability was measured by resting motor threshold (RMT) and cortical motor evoked potentials (cMEPs) in hand muscles induced by transcranial magnetic stimulation (TMS), and changes in intracortical inhibitory circuits were tested by short interval intracortical inhibition (SICI).

## 2. Experimental Section

### 2.1. Participants

Thirty healthy subjects were selected for participating in this study (Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow diagram on Figure 1). Recruitment of participants consisted of self-selection within the current users of our installations as well as asking the participants for referrals. Eleven healthy volunteers accepted informed consent and completed inclusion criteria with no known history of neurological disorders and accepted to participate in the study, and ten of them (7 men, 3 women; mean age =  $38 \pm 11$  years, age range: 24–60 years; Table 1) completed all three interventions, and were included in the data analysis (CONSORT flow diagram on Figure 1). One subject rejected to continue at the beginning of the study because of unpleasant sensation through cervical electrical stimulation. Inclusion criteria were: male or female between 18 and 65 years old without any neurological disorder and other disorder which could limit the experiment (uncontrolled cancer, arthritis, etc.), and had written informed consent. Exclusion criteria were any metal implants, implanted electrical devices, medications that could raise seizure threshold, cardiac conditions, and history of syncope or concussion with loss of consciousness, tinnitus, or pregnancy. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Institute Guttmann and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [21].



**Figure 1.** CONSORT 2010 flow diagram showing the number of subjects involved in each phase of the study.

**Table 1.** Demographic data from the ten subjects participating in the present study. Stimulation intensities employed during high-frequency electrical enabling motor control (eEmc) are also shown.

Subject	Sex	Age	Hand Preference	eEmc Intensity (mA)	
				C3–C4	C6–C7
1	male	44	right	29	32–38
2	male	60	right	59–67	69–77
3	female	25	right	28–30	30–32
4	female	27	left	34	36
5	female	33	right	52–54	59–63
6	male	41	right	34–38	45
7	male	24	right	36–50	56–59
8	male	51	right	52–63	63–77
9	male	39	right	59	72–74
10	male	38	both	54–67	63–77

## 2.2. Experimental Design

It was a randomized crossover study, which included three different interventions. Interventions consisted of: (i) hand grip training, (ii) eEmc, or (iii) eEmc combined with hand grip training. All participants received each intervention once with at least 1 week between each intervention.

For hand functional outcomes, we assessed MVC during hand grip force and BBT. For neurophysiological assessment at spinal cord level, we evaluated F wave of abductor pollicis brevis (APB) muscle and recruitment curves of sMEPs in hand and arm muscles induced by single-pulse tSCS, applied to C3–C4 and then to C6–C7. At cortical level: RMT and cMEPs induced by TMS in hand muscles at 120% of RMT and SICI were recorded. All neurophysiological recordings were done in the dominant upper extremity muscles. The functional and neurophysiological assessments were realized at baseline, just after intervention (starting at 0' post) and one hour after the end of intervention (starting at 60' post, follow-up) to evaluate the possible short- and long-lasting aftereffects of each intervention. The duration of each experiment was around 4 h including the set up. Each complete functional and neurophysiological assessment took 30–45 min for each timepoint and was carried out in the following order: BBT, MVC, F wave, cortical RMT, cMEPs, SICI, cMEP recruitment curve, spinal RMT, and sMEP recruitment curve.

## 2.3. Functional Assessment

### 2.3.1. Maximum Voluntary Contraction during Hand Grip Strength

The hydraulic hand grip dynamometer (Jamar Model 5030J1, Sammons Preston, NJ, USA) was used for MVC. Participants were asked to perform MVC for 4 s, as soon as they noticed a triggering stimulus, which was a mild electrical pulse at an intensity of 3 mA with 0.5 ms of duration delivered with ring electrodes to the fifth finger of the dominant hand. We recorded the maximal and maintained force during these 4 s in three consecutive trials, with at least one minute of rest between each trial. We registered the electromyographic (EMG) activity from the arm and hand muscles.

### 2.3.2. Box and Blocks Test

This is a test of manual dexterity consisting of a box with a center partition [22]. The participant must pick up the maximum number of small cube-shaped blocks, one at a time, and drop them at the other side of the partition in 60 s. The score of BBT is represented by the number of blocks transported.

## 2.4. Neurophysiological Assessment

### 2.4.1. Electromyographical Recording

EMG activity was recorded with a conventional EMG machine (Medelec Synergy, Oxford Instruments; Surrey, UK). After standard skin preparation, disposable adhesive

surface electrodes (outer diameter of 20 mm; Technomed) were placed over the muscle belly of the APB, abductor digiti minimi (ADM), flexor carpi radialis (FCR), extensor digitorum (ED), and biceps brachii (BB) muscles of the dominant arm, with the cathode proximal and the anode approximately 2 cm distally. The EMG signal was amplified and then filtered using a band-pass of 30 Hz–10 kHz, amplitude sensitivity of 0.1–0.5 mV and epochs of 100 ms sweep duration and recorded at a sampling rate of 50 kHz. During assessments, we ensured that the baseline EMG activity of all recorded muscles was lower than 50  $\mu$ V of amplitude before delivering each single stimulus: EMG activity was checked out online and, if necessary, the subject was reminded to be relaxed. If any background EMG activity was observed after stimulus delivery, this recording was eliminated in situ and stimulation procedure was repeated. EMG signals were stored in a Synergy computer and analyzed offline with MATLAB.

#### 2.4.2. F Wave

To measure the spinal motoneuron pool excitability, F wave was recorded in APB muscle using suprathreshold electrical median nerve stimulation at the wrist level [23,24]. Both stimulus delivery and EMG signal recording were processed by a conventional EMG machine (Medelec Synergy, Oxford Instruments; Surrey, UK). Electrical stimuli of 0.5 ms of duration were delivered at 1 Hz and the electrical intensity was set at supramaximal level to induce the maximal amplitude in M wave (Mmax) (range: 17–30 mA) [24]. A minimum of 10 stimuli were delivered to calculate F wave persistency [25].

#### 2.4.3. Recruitment Curve of sMEPs

To assess spinal cord excitability, we used monophasic rectangular 1-ms single-pulse tSCS delivered through 2 cm diameter hydrogel adhesive electrodes (axion GmbH, Hamburg, Germany) as cathodes at C3–C4 and then at C6–C7 and two 5  $\times$  12 cm rectangular electrodes placed symmetrically over the iliac crests as anodes. The electric intensity for spinal RMT in APB muscle of the dominant hand was determined at baseline condition in each intervention. RMT was defined as the lowest intensity that elicited sMEPs of  $\geq 50$   $\mu$ V peak-to-peak amplitude at APB muscle in at least 5 out of 10 consecutive trials. Recruitment curves of sMEPs were established at gradual increasing intensities from 90% to 150% of RMT (at 10% increments, three recordings at each intensity) in all recorded muscles of the dominant hand [14,26].

#### 2.4.4. Transcranial Magnetic Stimulation

Changes in corticospinal excitability and SICI were evaluated using a Magstim<sup>®</sup> BiStim<sup>2</sup> TMS (Magstim Company, Whitland, Wales, UK). Subjects were seated in a chair, resting their pronated forearms on a desk in front of them and were asked to stay relaxed but awake throughout the assessments. A figure-of-eight coil was held tangentially to the scalp over the motor area of the dominant hand in the optimal position for activating the APB in a posterior-anterior current direction. The hot point for evoking the largest cMEP in APB was marked over scalp. The following parameters were measured before, after, and during follow-up of each intervention: 1. RMT, defined as the lowest intensity of TMS that evoked a cMEP of  $\geq 50$   $\mu$ V peak-to-peak amplitude in the APB muscle in at least 5 of 10 consecutive trials. 2. Mean amplitude of cMEPs using single-pulse TMS at 120% of RMT of APB in five recordings. 3. SICI using paired-pulse TMS with a subthreshold conditioning stimulus (80% of RMT) and a suprathreshold test stimulus (120% of RMT) at interstimulus interval of 2 ms in 5 recordings without background activity (between 1 to 5 recordings for each subject were rejected because of background activity) [27]. 4. Recruitment curves were obtained at increasing intensities from 90% to 150% of RMT of APB, at 10% increments (three recordings at each intensity). The absence of baseline activation was verified before carrying out each of the abovementioned recordings.



### 2.5. Interventions

The study consisted of three interventions: (1) hand training, (2) eEmc, (3) eEmc combined with hand training. There was at least 1 week between each experiment.

Hand training protocol was adapted from previous studies [12] and consisted in grasping a hand grip dynamometer at maximum maintainable contraction for 20 s, followed by an 80-s resting period. This was repeated alternating right and left hands for 30 min (9 times per hand). Thus, the total duration of contractions for each treatment was 3 min for each hand and a total of 9 min of maximum effort for all three treatments for each muscle group. Mean sustained force was registered for each contraction. In all cases, the subjects were instructed and closely monitored to assure that a neutral wrist position and a 90° angle of the elbow was maintained while performing MVC with hand grip (Figure 2a).

A second condition consisted of delivering eEmc in the same time pattern (20 s of stimulation followed by an 80-s resting period for 30 min) in absence of hand training. eEmc was carried out with the transcutaneous electrical stimulator BioStim-5 (Cosyma Inc., Moscow, Russia). Previous reports indicate that applying stimulation simultaneously at two sites within the cervical area is consistently more effective than a single stimulation site [12]. Thus, we delivered eEmc simultaneously at two sites along the midline between spinous processes C3–C4 and C6–C7 during the corresponding intervention period. Regarding the possible mechanisms involved, it is critical to recognize that the intensity of stimulation at each spinal level was set at 90% of RMT induced by single-pulse tSCS at APB muscle of the dominant hand (range: ~30–80 mA, Table 1). Stimulation was continuously delivered using 2 cm diameter hydrogel adhesive electrodes (axion GmbH, Hamburg, Germany) as cathodes and two 5 × 12 cm rectangular electrodes placed symmetrically over the iliac crests as anodes. eEmc employed biphasic rectangular 1-ms pulses, each one filled with a carrier frequency of 10 kHz (i.e., each 1-ms pulse was composed of ten 0.1-ms biphasic rectangular pulses), that were delivered at a frequency of 30 Hz [13,17,28]. During stimulation, the subjects reported a non-painful but uncomfortable tingling sensation down the arms and at the site of stimulation, with some associated tonic contraction of paraspinal and posterior neck muscles.

The last condition was eEmc combined with hand training. The subjects performed maximum sustainable contractions and simultaneously received eEmc, alternating right and left hands for 30 min. The abovementioned tonic contraction of neck muscles during stimulation did not interfere with performance of repeated grip contractions, since force levels achieved in the dynamometer during this intervention were similar to those achieved during hand training without stimulation and participants reported no impediments to perform the training.

### 2.6. Data Analysis and Statistics

For each assessment, we calculated the mean  $\pm$  standard error measurement (SEM) at baseline, right after and sixty minutes after intervention (0' post and 60' post intervention respectively) in each condition. We calculated the % changes according to baseline for each timepoint evaluation when appropriate. BBT, cMEP, SICI, and cMEP slopes could be easily compared between interventions without this normalization, so absolute values were preserved. The analysis of these outcome measures revealed the same effects if normalized.

For analyzing EMG activity during MVC, the area under the curve (AUC) in EMG of each muscle was calculated from the beginning of EMG signal during 4 s of MVC.

For the F wave analysis, we measured the peak-to-peak amplitude and for Mmax we measured the maximum amplitude of M wave. F wave was considered if peak-to-peak amplitude was at least 1% of M wave (Mmax) amplitude and F persistence was calculated by dividing the number of F responses by the number of stimuli from 10 recordings. The maximum amplitude of F was normalized to Mmax amplitude to obtain Fmax/Mmax ratio.

For recruitment curve of sMEPs and cMEPs, we measured the peak-to-peak MEP amplitude ( $\mu$ V) induced in each recording of all muscles and then we calculated the mean amplitude of MEPs from three recordings for each intensity for each subject and for each

experimental condition. To detect the possible influence of each intervention and counteract the masking effect of interindividual variability, recruitment curves obtained at 0' post and 60' post intervention were normalized to baseline recruitment curves (which were considered as 0% change for all intensities) registered for each session and each subject. As a measure of corticospinal excitability, in addition, slope of non-normalized recruitment curves was calculated through linear regression from 90% to 150% RMT intensities, an interval that fitted linear distribution in all conditions and muscles [29].

For calculating SICI percentage, averaged peak-to-peak amplitude of the conditioned cMEP (obtained after the conditioning stimulus of 80% RMT with 2 ms separation from conditioned stimulus of 120% RMT) was expressed as a percentage of the averaged amplitude of the test cMEP (obtained at supramaximal 120% RMT stimulus): % = (conditioned cMEP/test cMEP)  $\times$  100.

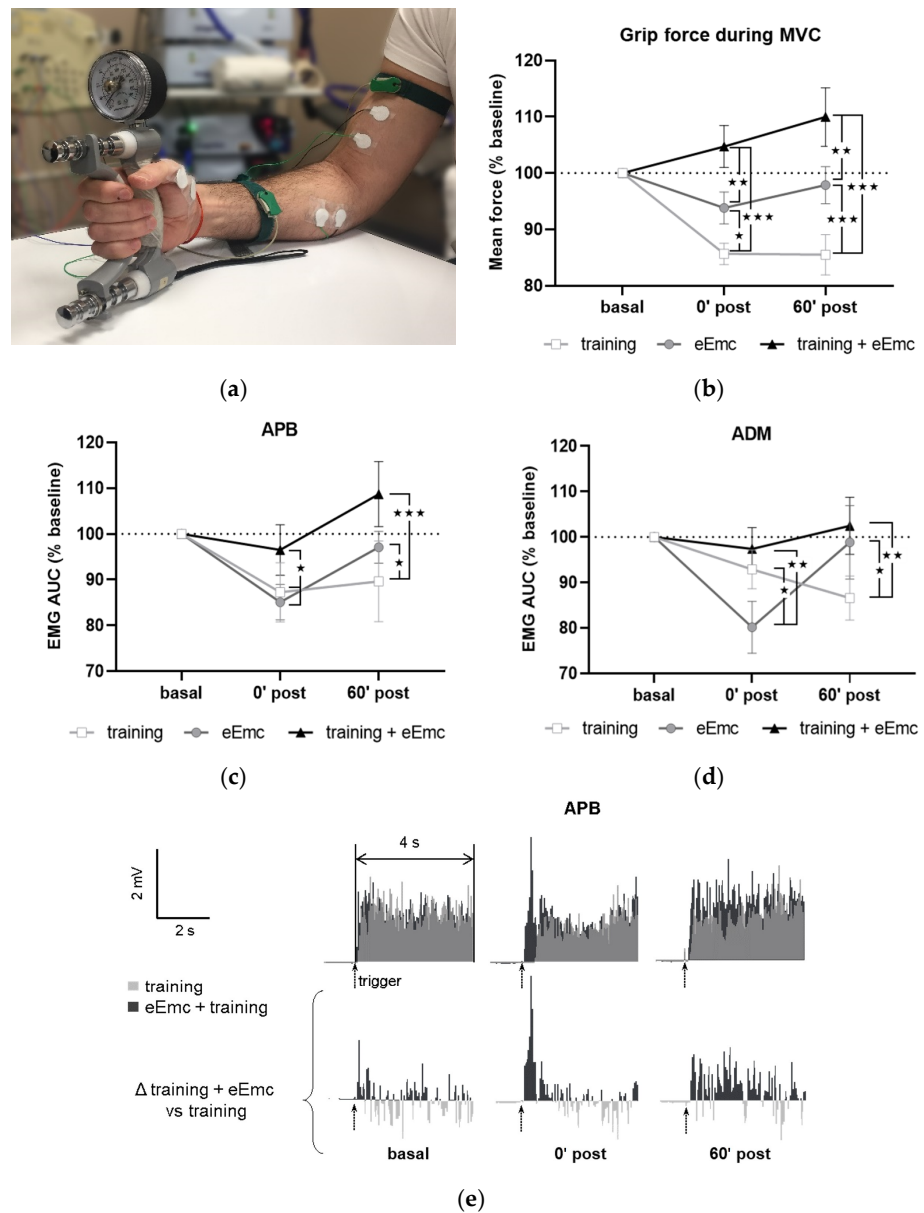
Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Shapiro–Wilk test was used to assess whether data were normally distributed or not. All sets of data fulfilled normal distribution requirement except F wave persistence, cortical RMT, SICI, and cMEP slope. For normally distributed data, repeated measures two-way analysis of variance (ANOVA) was used. For post-hoc analysis, we used Tukey's test. For not normally distributed data, Friedman's analysis was used followed by post-hoc Dunn's test. Least squares regression was applied as linear regression method to calculate slope of sMEP and cMEP recruitment curves. Significance level was set at  $p < 0.05$  in all cases.

### 3. Results

#### 3.1. Hand Motor Output

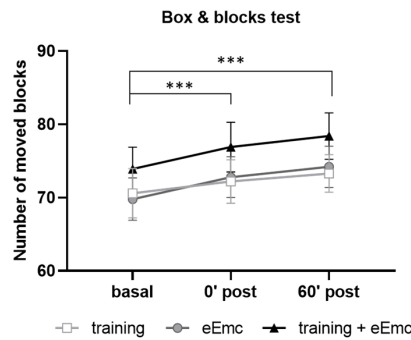
Figure 2a shows a general setting for MVC assessment. MVC at baseline was  $30.6 \pm 0.9$  kg. This value was consistent between sessions (within-subject variation coefficient was  $10.9 \pm 1.2\%$ ), although inter-subject variability was considerable (between-subjects variation coefficient was  $28.7 \pm 3.0\%$ ). Thus, all values were normalized to baseline for further analysis. Repeated-measures ANOVA showed that intervention ( $F_{(2, 18)} = 11.2, p < 0.001$ ) and timepoint ( $F_{(2, 18)} = 3.67, p < 0.05$ ) factors, as well as their interaction ( $F_{(4, 36)} = 8.77, p < 0.001$ ) had a significant effect in MVC. MVC tended to increase following eEmc combined with training and did not change after eEmc alone, whereas training alone reduced MVC significantly after intervention during follow-up ( $p < 0.001$  according to Tukey's post hoc). The percentage of MVC vs. baseline levels was bigger after eEmc with training compared to training alone at 0' and 60' post intervention ( $p < 0.001$  for each comparison) and also compared to eEmc intervention alone ( $p < 0.01$  for each comparison) (Figure 2b).

The EMG activity of APB and ADM changed significantly according to two-way ANOVA ( $F_{(1, 52)} = 16.43, p < 0.001$  and  $F_{(1, 52)} = 6.77, p < 0.01$ , respectively) (Figure 2c,d). There was a significant interaction between intervention and timepoint factors for APB and ADM muscles ( $F_{(4, 36)} = 3.36, p < 0.05$  and  $F_{(4, 36)} = 4.34, p < 0.01$ , respectively). Tukey's test showed that the training condition significantly reduced EMG activity of APB (at 0' and 60' post training) and ADM (at 60' post intervention) ( $p < 0.05$ ). Moreover, EMG activity in APB and ADM was significantly lower following training or eEmc alone than following eEmc with hand training at both 0' and 60' post-intervention ( $p < 0.05$  at least for each comparison) (Figure 2c,d). The EMG of FCU, ED, or BB muscles did not change significantly by intervention or timepoint according to two-way repeated measures ANOVA. Figure 2e shows a representative EMG of APB muscle (subject #5) corresponding to MVC trials during "training" and "eEmc with training" interventions. This figure depicts similar EMG activity levels at basal conditions before these two interventions, but higher EMG activity at both 0' post and 60' after the combined intervention, an effect that becomes obvious when calculating the difference in EMG activity between "eEmc with training" and "training" condition.



**Figure 2.** Maximal voluntary contraction (MVC) during hand grip strength. (a) Picture showing general setting and position for hand grip MVC assessment. (b) Percentage of MVC vs. baseline levels at 0 min (0' post) and 60 min (60' post) after each intervention. Significant differences between interventions: ★  $p < 0.05$ , ★★  $p < 0.01$ , ★★★  $p < 0.001$ . (c,d) Percentage of area under the curve (AUC) of electromyographic (EMG) activity vs. baseline levels from APB (c) and from ADM (d). Significant differences between interventions: ★  $p < 0.05$ , ★★  $p < 0.01$ , ★★★  $p < 0.001$ . (e) Representative APB muscle EMG registry (obtained from subject #5) corresponding to maximum voluntary contraction (MVC) trials during training and eEmc with training interventions at basal, 0' and 60' after intervention. Upper panels correspond to rectified values, and lower panels show difference between registers of both interventions for better difference appreciation. APB, abductor pollicis brevis; ADM, abductor digiti minimi.

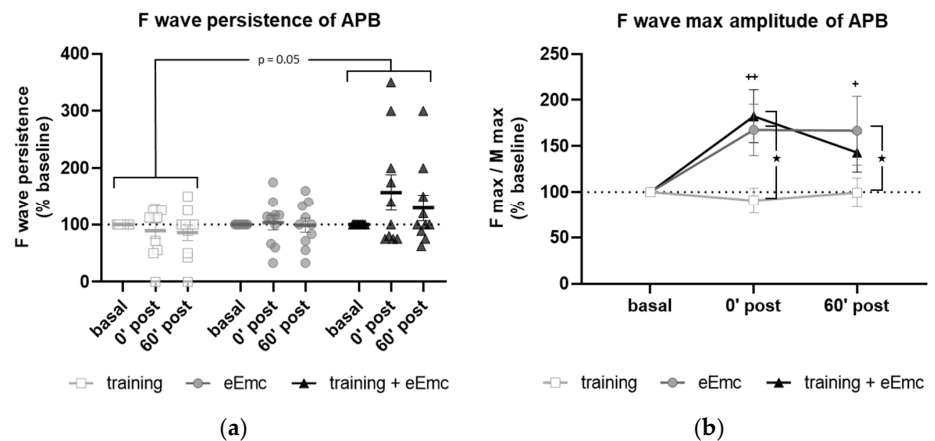
Manual dexterity was assessed with the BBT in order to detect possible alterations induced by power grip training and/or eEmc-based interventions. Two-way ANOVA did not show an effect of intervention ( $F_{(2, 18)} = 2.62, p = 0.10$ ) neither timepoint  $\times$  intervention interaction ( $F_{(4, 36)} = 0.206, p = 0.93$ ). However, there was a significant timepoint effect ( $F_{(2, 18)} = 43.5, p < 0.001$ ) with increasing number of boxes, being significantly higher just after intervention (0') and during follow-up (60') in comparison to basal evaluation when equally considering all interventions ( $p < 0.001$ ) (Figure 3).



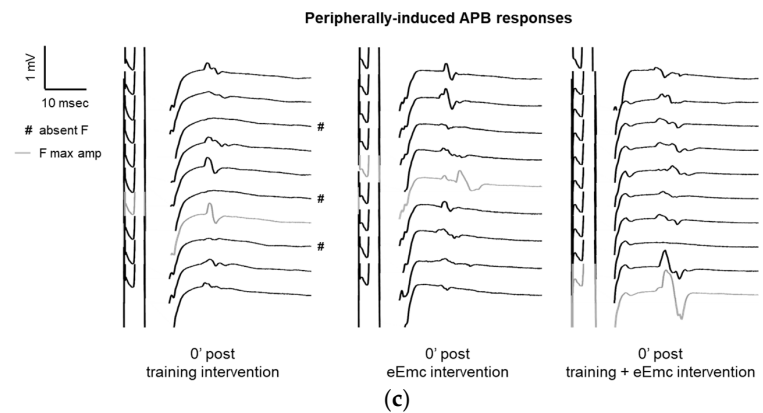
**Figure 3.** Number of moved blocks in the box and blocks test (BBT) for hand training, eEmc, or combination of both interventions right after intervention (0' post) and during follow-up (60' post) in comparison to basal evaluation. Significant differences between timepoints according to Tukey's multiple comparisons (considering all intervention groups as a whole): \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.2. Spinal Cord Excitability

F wave was used to detect excitability of anterior horn motoneurons in the spinal cord. There was a significant effect of intervention over F wave persistence (Friedman's test = 5.84, df 3.30,  $p = 0.05$ ) (Figure 4a). Dunn's post-hoc comparisons revealed an overall increase in F persistence after eEmc combined with training compared to training alone that almost reached statistical significance ( $p = 0.053$ ). The intervention factor had a nearly significant impact on F wave amplitude ( $F_{(2, 18)} = 3.10, p = 0.07$ ). Post hoc comparisons showed that eEmc delivery, with or without hand training, increased F wave amplitude when compared to training alone ( $p < 0.05$ ), particularly at 0' post intervention (Figure 4b,c).



**Figure 4.** Cont.



**Figure 4.** Variables of F waves in APB by median nerve stimulation. (a) F wave persistency. Significant difference between eEmc with training and training alone (regardless of the timepoint):  $p = 0.05$ . Data expressed as median  $\pm$  interquartile range. (b) Averaged maximum amplitude of F wave for each condition and timepoint. Significant differences vs. baseline:  $^+ p < 0.05$  (for training + eEmc),  $^{++} p < 0.01$  (for eEmc alone), and between interventions:  $^{\star} p < 0.05$ . (c) Representative APB muscle registers (obtained from subject #7) corresponding to ten consecutive median nerve stimulations showing M and F wave at 0' after in each intervention. Light grey registers highlight F waves with maximum amplitude. # Symbol indicates registers where no F wave presence was considered. APB, abductor pollicis brevis.

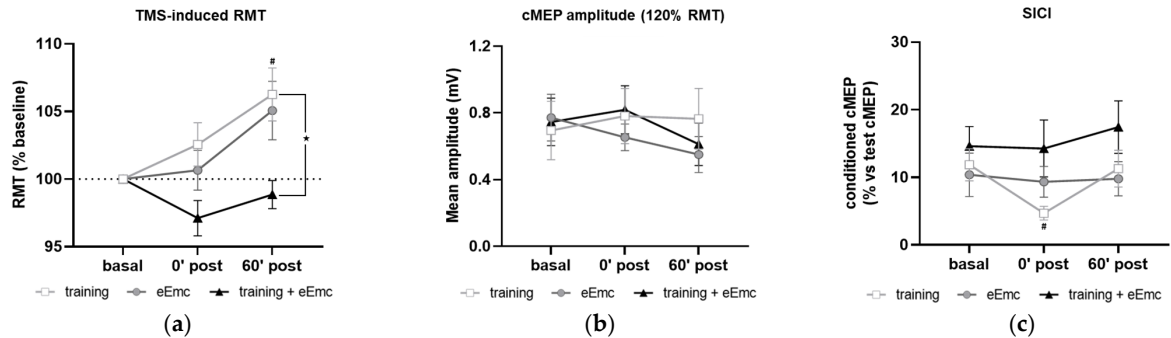
Excitability of spinal networks was tested by single-pulse tSCS at cervical level. The RMT in APB at baseline was of  $51.0 \pm 2.9$  mA at C3–C4 and  $60.8 \pm 3.5$  mA at C6–C7. The recruitment curve of sMEP from upper extremity muscles did not show any significant changes in any muscle at any intensity and in any intervention ( $p > 0.05$ ) (Table S1).

### 3.3. Corticospinal Excitability and Intracortical Inhibition

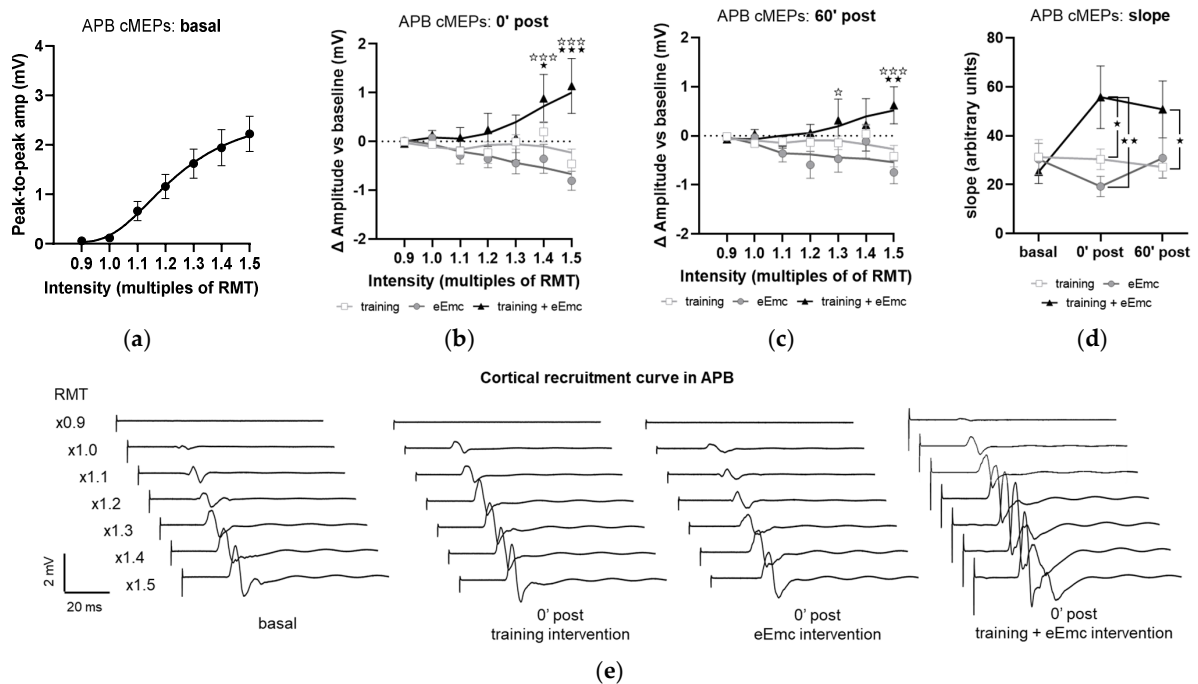
The RMT in APB at basal conditions was  $37.9 \pm 1.2\%$  of maximum TMS intensity. RMT was significantly affected by timepoint in the training intervention (Friedman's test = 7.93, df 3.10,  $p < 0.05$ ) and by intervention at 60' post (Friedman's test = 8.06, df 3.10,  $p < 0.05$ ) (Figure 5a). Dunn's post-hoc comparisons confirmed that higher RMT was found 60' after training ( $p < 0.05$ ). eEmc with training significantly reduced RMT when compared to training alone at this timepoint ( $p < 0.05$ ). Corticospinal excitability measured by cMEP amplitude obtained at 120% RMT stimulus did not differ between interventions ( $F_{(2, 18)} = 0.25, p = 0.77$ ) or between timepoints ( $F_{(2, 18)} = 1.55, p = 0.23$ ) (Figure 5b).

SICI was significantly affected by timepoint in the training intervention (Friedman's test = 7.40, df 3.10,  $p < 0.05$ ). Dunn's post hoc analysis revealed that hand training induced higher inhibition (i.e., smaller conditioned cMEP amplitude) at 0' post-intervention ( $p < 0.05$ ) compared to baseline, with no other significant comparisons (Figure 5c).

The recruitment curves of cMEP at baseline did not significantly differ between interventions in any muscle and appear represented as a single pool in Figure 6a, which shows APB data. Analysis of APB muscle recruitment curves normalized to baseline showed significant intervention  $\times$  timepoint interaction after intervention ( $F_{(12, 108)} = 3.59, p < 0.001$ ) and during follow-up ( $F_{(12, 108)} = 1.58, p < 0.05$ ). Specifically, eEmc with training enhanced cMEP amplitude significantly in comparison to training and eEmc alone at high TMS-stimulation intensities ( $1.4\times$  and  $1.5\times$  RMT at 0' post-intervention and  $1.3\times$  and  $1.5\times$  RMT at 60' post-intervention; Figure 6b,c). Corticospinal excitability was also quantified by calculating the slope of non-normalized absolute recruitment curves, which also resulted in a significant effect of intervention (Friedman's test = 8.08, df 3.30,  $p < 0.05$ ), with higher slopes for APB after eEmc with training compared to training or eEmc alone at 0' and 60' post-intervention, according to Dunn's multiple comparisons (Figure 6d, Table S2). There were no significant differences for slopes analyzed for other muscles (Table S2).



**Figure 5.** Effect of hand training, eEmc and eEmc + training on the corticospinal excitability and SICI. (a) Percentage of resting motor threshold (RMT) vs. baseline levels in APB at 0 min (0' post) and 60' min (60' post) after intervention. Significant differences between interventions: ★  $p < 0.05$ , (training vs. eEmc + training), and in comparison to baseline: #  $p < 0.05$  (for training). (b) Effect of training, eEmc and eEmc + training on the supramaximal cMEP amplitude (120% transcranial magnetic stimulation (TMS)) according to RMT. (c) SICI: (average of conditioned cMEP)  $\times$  100/ (average of test cMEP) recorded at APB muscle and obtained at 0' and 60' after each intervention. #  $p < 0.05$  for training at 0' post in comparison to baseline. APB, abductor pollicis brevis; RMT, resting motor threshold; cMEP, cortically-induced motor evoked potential; SICI, short-interval intracortical inhibition.



**Figure 6.** Effect of interventions on cortical recruitment curve. (a) Pooled APB recruitment curves obtained at baseline for each subject and intervention. (b,c) Increase or decrease (in millivolt (mV); indicated as  $\Delta$ ) in APB recruitment curves with respect to baseline at 0' (b) and 60' (c) post intervention. ★  $p < 0.05$ , ★★  $p < 0.01$ , ★★★  $p < 0.001$  training vs. training + eEmc; ☆  $p < 0.05$ , ☆☆☆  $p < 0.001$  eEmc vs. training + eEmc. (d) Slope of APB cMEP recruitment curves. Indicated slopes correspond to the slope of the linear regression line through stimulation intensities (in %RMT) and cMEP values (in mV), multiplied  $\times$  1000 to facilitate data visualization. ★  $p < 0.05$ , ★★  $p < 0.01$ , between interventions at 0' post and 60' post. (e) Representative APB muscle recording (obtained from subject #1) corresponding to recruitment curve assessment at basal (three conditions averaged) and 0' post each intervention. APB, abductor pollicis brevis; RMT, resting motor threshold; cMEPs, cortically-induced motor evoked potentials.

#### 4. Discussion

The present study shows that one single session of cervical eEmc modifies the excitability of neuronal networks controlling upper limb function in healthy subjects. These changes strongly depend on eEmc combined with hand training, improving hand grip force and increasing spinal and corticospinal excitability in comparison to each intervention tested alone. Indeed, eEmc alone increased cervical spinal cord excitability measured by anterior horn motoneuron excitability, but had no effect on corticospinal excitability or hand grip force, while hand training alone reduced hand grip force, corticospinal excitability, and intracortical inhibition. The effects of eEmc combined with hand training appeared immediately after the intervention and were observed in hand grip force measured by MVC, in spinal cord excitability measured by F wave, and in corticospinal excitability measured by RMT induced by TMS and cMEP recruitment curve, and these effects lasted at least one hour in most clinical and neurophysiological assessments.

Previous studies in SCI patients have reported improved hand motor performance following eEmc, even after one single session [11–14,17]. However, it is not clear whether eEmc benefits or not from simultaneous physical training to deploy its full potential to facilitate motor improvement. Indeed, although eEmc has been mostly delivered together with training, improvements were reported in hand function immediately after eEmc in absence of any hand training and persisted for at least 75 min following 20 min of 30 Hz stimulation [14].

Diverse modalities of spinal cord stimulation, traditionally employed to treat chronic pain, interfere with proprioceptive and sensitive processing [30]. The lack of differences observed between interventions in the BBT indicates that eEmc does not interfere with manual dexterity as might be observed if stimulation altered sensorial/proprioceptive processing or precise motor control. Of note, progressive improvement shown after repeated BBT testing in all groups suggests some form of motor or cognitive learning that allows improved task performance, and importantly, this process is not compromised by eEmc exposure either. As expected, however, we did not observe any improvement after eEmc exposure since little space for dexterity refinement is left in uninjured participants at this particular task.

Unlike eEmc or the combined treatment, hand training alone resulted in a significant decrease in hand grip force as shown by reduced MVC, an effect that lasted at least one hour. The decline in hand grip force was partially correlated with changes in EMG activity of the hand muscles APB and ADM but not with more proximal arm muscles (Figure 3b,c). This was probably due to fatigue at peripheral and/or central level, since the voluntary effort performed by all subjects was maximal although it did not reach the force level achieved in basal conditions, accordingly to previous observations in similar settings (reviewed in [31]). This was unsurprising due to the nature of the intervention (i.e., repetitive maximal contractions for 30 min). Interestingly, whereas MVC strength remained relatively unaltered after eEmc delivery alone as no exercise-induced fatigue could be present, an increase in grip force was observed after eEmc together with training when compared to both hand training and eEmc alone, even 1 h after the intervention. This suggests that eEmc delivery, together with hand training, is probably counteracting the fatigue effect induced by concomitant exercise, but other mechanisms are required to explain the differences compared to eEmc alone. Moreover, the maintenance of EMG activity levels after the combined intervention suggests that eEmc requires concomitant hand training to more successfully sustain the recruitment of muscle fibers and muscle contraction levels. The fatiguing and the compensatory effects are likely to be a combination of neural and muscular elements [32].

F wave has been considered an indirect measure of motoneuron pool excitability [33] and reflects backfiring of a small number of motoneurons which are reactivated by antidromic impulses following supramaximal stimulation of a peripheral nerve. Increased Fmax/Mmax amplitude ratios (by means of increased Fmax and constant Mmax) observed after eEmc alone, with or without hand training, indicated that a higher portion of the

motoneuron pool can be activated by an antidromic stimulus after eEmc intervention. We also observed higher F persistence when eEmc was applied simultaneously to hand training during the intervention. Whereas F max amplitude may reflect the maximal number of motoneurons backfiring simultaneously, F persistence may reflect the probability of these motoneurons to backfire at the same time. Since the probability to successfully produce an orthodromic action potential after antidromic depolarization depends on the refractory period of the axonic cone [34], it is possible that eEmc alone is sufficient to increase motoneuron excitability but somehow does not favor optimal refractory period conditions to increase F wave occurrence. Moreover, it has been shown that pre-activation increases the occurrence of F wave in neurons with a low number of F waves at rest, but not in those neurons with high basal number of F responses [35]. Considering this, a possibility might be that hand grip training focuses eEmc-induced excitability to a discrete spinal neuronal population, perhaps the one contributing to grip performance.

Previous reports show that tSCS at the cervical level generally reaches anterior horn motoneurons through activation of dorsal root afferents, as shown by elicited bilateral monosynaptic reflexes [36,37], although tSCS can however preferentially activate sensory or motor roots depending on the stimulation parameters and electrode location [38,39]. A recent work shows that eEmc applied at the cervical spinal cord is able to increase the excitability of spinal networks in uninjured and SCI participants [14], which goes in line with increased motoneuron excitability observed in our study. In the work of Benavides et al., sMEPs were elicited by cervicomedullary magnetic stimulation and showed increased amplitude in proximal and distal arm muscles for 75 min following tSCS, but not sham-tSCS. In contrast, we could not observe any difference between interventions on sMEPs elicited by single-pulse tSCS. A reason for this discrepancy could rely on the different current distribution within the spinal cord elicited by magnetic and electrical stimulation, or perhaps our single-pulse tSCS-based method to recruit upper limb muscles resulted not sensitive enough to detect such changes at the level of spinal network excitability. However, since eEmc delivers electrical currents at intensities below the RMT, an indirect (more than a direct) effect on cervical spinal networks may have increased motoneuron excitability.

Corticospinal excitability is known to be altered due to physical training and also to diverse modalities of CNS stimulation [14,24,31,40]. Both voluntary muscular activity (e.g., sustained maximal contractions) and “imposed” muscular activity (induced by sustained electrical stimulation at motor point) reaching fatiguing levels result in transiently decreased corticospinal excitability [40]. In agreement, we found increased TMS-evoked RMT after hand grip training and after eEmc without training, an effect that persisted at least 1 h after each intervention. TMS-evoked RMT, however, remained unaltered after eEmc with hand training. In addition, recruitment curves at APB muscle showed higher cMEP amplitude after eEmc with hand training than each intervention separately. Recruitment curves of cMEP from muscles other than APB did not show this enhancement, possibly because TMS was optimized to recruit APB. Increased cMEP amplitude in the APB recruitment curve entails that the number of spinal motoneurons recruited at particular TMS stimulation intensities is higher after eEmc with training than after each intervention alone. This could reflect changes at any level within the corticospinal motor pathway controlling the APB muscle: intracortical circuits favoring cortical primary motoneuron to depolarize, excitability of cortical motoneurons itself, axonal corticospinal conductivity, spinal premotor networks favoring spinal motoneuron depolarization, excitability of spinal motoneurons itself, peripheral axonal conductivity, or efficiency at the neuromuscular junction level [41]. Thus, increased spinal excitability itself reflected as F wave facilitation after eEmc, with or without hand training, could contribute to increased corticospinal excitability. This finding might also be explained by the different mechanisms underlying cMEP depression after exercise or after electrical stimulation. As discussed by Pitcher et al., cMEP depression may emerge as an adaptation to tonic afferent input to the cortex from the exercising muscle (presumably Golgi tendon organs or group III and non-spindle group II afferents [42]), altering cortical excitability without altering spinal excitability. On



the other hand, peripheral electrical stimulation initially induces cMEP facilitation [43] until prolonged stimulation leads to cMEP depression reflecting cortical plasticity [40]. In our study, since electrical stimulation is applied at spinal level, and enhances spinal excitability, several concurrent (but opposing) effects might be taking place, and corticospinal output may depend on their final balance. Thus, a possible explanation for increased corticospinal output after eEmc with training includes that spinal cord stimulation could interfere with afferent inputs to the cortex from the exercising muscle, counteracting the effect of muscular activity.

Given that intracortical networks influence corticospinal output, and that exercise-induced decrease in corticospinal excitability has been ascribed to intracortical rather than spinal mechanisms [40], we assessed SICI to reveal the possible modulation of inhibitory circuits in the primary motor cortex [44]. We observed increased intracortical inhibition right after power grip training, which may be surprising given that fatiguing exercise usually leads to reduced inhibition [45,46]. However, this event has been reported *during* maximal contractions, being already absent at 7–10 min after ceasing the exercise. In addition, increased excitability of intracortical inhibitory circuits (i.e., increased SICI) occurs *after* relaxation from voluntary contractions [47], a phenomenon that has been interpreted as a rebound effect after relaxation. This may explain our observations and further supports our vision supporting that eEmc combined with training prevents its fatigue-induced effects. On the other hand, we could not find any effect of eEmc, with or without hand training, on intracortical inhibition. These results differ from a recent study reporting increased SICI after eEmc alone that lasted for more than 1 h [14]. Methodological differences might explain these divergences, such as duration of stimulation, frequency stimulation, and simultaneous evaluation of other parameters together with SICI in the present study. Notably, eEmc delivered simultaneously to hand training prevented the alterations observed in SICI after hand training alone. This might suggest, again, the possible prevention of fatigue induced by simultaneous eEmc, indicating that the modulation of intracortical inhibitory motor circuits by eEmc delivered with hand training contributes to increased corticospinal excitability observed after this intervention. However, further studies are needed to confirm this hypothesis by accurately controlling the time-course of SICI during and after each intervention.

Mechanisms of plasticity observed in unimpaired subjects will, to some extent, be extrapolable to individuals with complete and incomplete spinal cord injury (SCI), since a portion of neural substrates remains preserved after SCI. Indeed, even in very severe injuries with completely abolished motor and sensory function, some spinal axons survive at the epicenter of the injury [48,49]. Thus, SCI population may benefit not only from plastic changes taking place in spinal neurons but also from the possible enhancement of the descending motor drive through residual corticospinal projections (or other descending systems), and via the interneurons that form the propriospinal system forming intersegmental connections ipsilaterally and bilaterally. However, this benefit might be limited, particularly below the injury, by the amount of spared brain-to-spine connections.

Activity-based neural plasticity mechanisms involve both physiological (functional modification of existing synapses and neurones) and structural changes that alter the anatomical connectivity of neurones (circuit reorganization by means of formation, removal, and morphological remodeling of synapses, dendritic spines, and even neurites) (reviewed in [50]). In the present study, signs of neural plasticity were observed after a single training and/or stimulation session, suggesting that short-term plastic changes were taking place. These may primarily affect intrinsic properties of neurons to depolarize and generate an action potential, including, for instance, modulation or relocation of ion channels and surface receptors. Sustained and/or repeated exposure to this activity-dependent plasticity (based either on physical training, electrical stimulation, or both) may lead these short-term changes to promote occurrence of long-term plasticity involving mechanisms, such as long-term potentiation and depression, morphological changes of dendrites, synaptogenesis, and axonal branching/regeneration [20]. Based on our findings,

rehabilitative strategies involving the simultaneous application of physical training and spinal electrical neuromodulation may have more chances to induce long-term plastic adaptations than either intervention alone.

### Limitations

We acknowledge diverse limitations present in the current study: (i) sample size was relatively small, which might compromise statistical power and subsequent interpretation of the results. Indeed, only a third of all screened candidates finally participated in the study (see Figure 1), and this was in great part due to candidate refusal to participate, probably because of concerns about discomfort associated to cervical stimulation, possible side effects of the intervention and limited availability of participants (each testing session required around 4 h to be completed). (ii) The duration of the testing sessions also resulted exhausting for participants, limiting the number of replicates that could be recorded for some neurophysiological parameters (recruitment curve, cMEP, SICI). This might increase variability in the observed data as well. (iii) Since many parameters were measured, it is possible that testing itself influenced those measured in the last place. Moreover, care should be taken when interpreting temporal patterns observed at 0' and 60' post-intervention, which may correspond to longer timepoints in fact since complete functional and neurophysiological assessment lasted 30–45 min. (iv) We did not assess afferent processing. For this reason, we cannot conclude about the possible roles of altered afferent pathways on the observed results.

### 5. Conclusions

As a summary, eEmc combined with hand training enhanced hand motor output in healthy subjects as observed in power grip performance when compared to hand training or eEmc applied separately. This effect was associated to increased corticospinal excitability that was due, at least in part, by plastic changes induced at spinal level and possibly at cortical level. These changes may also possibly reflect prevention of fatigue-associated alterations induced by physical training. Therefore, eEmc combined with use-dependent interventions should be considered when designing rehabilitation protocols for restoring motor performance following stroke, SCI, or other neurological affections compromising motor function.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/195/s1>, Table S1: Slopes of recruitment curves of tSCS-elicited spinal MEPs for each analysed muscle, intervention and timepoint, Table S2: Slopes of recruitment curves of TMS-elicited cortical MEPs for each analysed muscle, intervention and timepoint.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.K., Á.F., G.G.-A., J.V.; methodology, H.K., Á.F., M.R.-C., L.G., J.B.-P., G.G.-A., J.V.; software, M.R.-C.; formal analysis, H.K., Á.F., M.R.-C.; validation, H.K., Á.F., M.R.-C., G.G.-A., J.V.; investigation, H.K., Á.F., M.R.-C., L.G., G.G.-A., J.V.; resources, H.K., M.R.-C., J.B.-P., G.G.-A., J.V.; data curation, H.K., Á.F., M.R.-C., L.G.; writing—original draft preparation, H.K., Á.F.; writing—review and editing, H.K., Á.F., M.R.-C., V.R.E., L.G., J.B.-P., X.N., Y.G., G.G.-A., J.V.; visualization, H.K., Á.F., G.G.-A.; supervision, H.K., V.R.E., J.B.-P., X.N., Y.G., G.G.-A., J.V.; project administration, H.K., J.B.-P., G.G.-A., J.V.; funding acquisition, H.K., Y.G., G.G.-A., J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by H2020-ERA-NET Neuron (AC16/00034) to J.V.; AES 2019 ISCIII (PI19/01680) to J.V.; Fundació La Marató de TV3 2017 (201713.31) to G.G.-A.; Premi Beca “Mike Lane” 2019-Castellers de la Vila de Gràcia to H.K.; and National Institutes of Health Grant 1R01 NS102920-01A1 to Y.G. The APC was funded by Fundació La Marató de TV3 2017 (201713.31).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Institut Guttmann (protocol code 2017255 and date of approval: 29/04/2017).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

**Conflicts of Interest:** V.R.E. and Y.G. hold shareholder interest in NeuroRecovery Technologies and hold certain inventorship rights on intellectual property licensed by The Regents of the University of California to NeuroRecovery Technologies and its subsidiaries. Y.G. also holds shareholder interest in Cosyma Inc., St. Petersburg, Russia. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Moritz, C. A giant step for spinal cord injury research. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 1647–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harkema, S.; Gerasimenko, Y.; Hodes, J.; Burdick, J.; Angeli, C.; Chen, Y.; Ferreira, C.; Willhite, A.; Rejc, E.; Grossman, R.G.; et al. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: A case study. *Lancet* **2011**, *377*, 1938–1947. [[CrossRef](#)]
- Minassian, K.; Hofstoetter, U.S.; Danner, S.M.; Mayr, W.; Bruce, J.A.; McKay, W.B.; Tansey, K.E. Spinal Rhythm Generation by Step-Induced Feedback and Transcutaneous Posterior Root Stimulation in Complete Spinal Cord–Injured Individuals. *Neurorehabil. Neural Repair* **2016**, *30*, 233–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Angeli, C.A.; Boakye, M.; Morton, R.A.; Vogt, J.; Benton, K.; Chen, Y.; Ferreira, C.K.; Harkema, S.J. Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1244–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gill, M.L.; Grahn, P.J.; Calvert, J.S.; Linde, M.B.; Lavrov, I.A.; Strommen, J.A.; Beck, L.A.; Sayenko, D.G.; Van Straaten, M.G.; Drubach, D.I.; et al. Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1677–1682. [[CrossRef](#)]
- Wagner, F.B.; Mignardot, J.-B.; Le Goff-Mignardot, C.G.; Demesmaeker, R.; Komi, S.; Capogrosso, M.; Rowald, A.; Seáñez, I.; Caban, M.; Pirondini, E.; et al. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. *Nature* **2018**, *563*, 65–71. [[CrossRef](#)]
- Lu, D.C.; Edgerton, V.R.; Modaber, M.; AuYong, N.; Morikawa, E.; Zdunowski, S.; Sarino, M.E.; Sarrafzadeh, M.; Nuwer, M.R.; Roy, R.R.; et al. Engaging Cervical Spinal Cord Networks to Reenable Volitional Control of Hand Function in Tetraplegic Patients. *Neurorehabil. Neural Repair* **2016**, *30*, 951–962. [[CrossRef](#)]
- Hofstoetter, U.S.; Hofer, C.; Kern, H.; Danner, S.M.; Mayr, W.; Dimitrijevic, M.R.; Minassian, K. Effects of transcutaneous spinal cord stimulation on voluntary locomotor activity in an incomplete spinal cord injured individual. *Biomed. Tech. (Berl.)* **2013**, *58* (Suppl. 1). [[CrossRef](#)]
- Gerasimenko, Y.P.; Lu, D.C.; Modaber, M.; Zdunowski, S.; Gad, P.; Sayenko, D.G.; Morikawa, E.; Haakana, P.; Ferguson, A.R.; Roy, R.R.; et al. Noninvasive Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis. *J. Neurotrauma* **2015**, *32*, 1968–1980. [[CrossRef](#)]
- Sayenko, D.G.; Rath, M.; Ferguson, A.R.; Burdick, J.W.; Havton, L.A.; Edgerton, V.R.; Gerasimenko, Y.P. Self-Assisted Standing Enabled by Non-Invasive Spinal Stimulation after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **2019**, *36*, 1435–1450. [[CrossRef](#)]
- Freyvert, Y.; Yong, N.A.; Morikawa, E.; Zdunowski, S.; Sarino, M.E.; Gerasimenko, Y.; Edgerton, V.R.; Lu, D.C. Engaging cervical spinal circuitry with non-invasive spinal stimulation and buspirone to restore hand function in chronic motor complete patients. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gad, P.; Lee, S.; Terrafranca, N.; Zhong, H.; Turner, A.; Gerasimenko, Y.; Edgerton, V.R. Non-Invasive Activation of Cervical Spinal Networks after Severe Paralysis. *J. Neurotrauma* **2018**, *35*, 2145–2158. [[CrossRef](#)]
- Inanici, F.; Samejima, S.; Gad, P.; Edgerton, V.R.; Hofstetter, C.P.; Moritz, C.T. Transcutaneous Electrical Spinal Stimulation Promotes Long-Term Recovery of Upper Extremity Function in Chronic Tetraplegia. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2018**, *26*, 1272–1278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Benavides, F.D.; Jo, H.J.; Lundell, H.; Edgerton, V.R.; Gerasimenko, Y.; Perez, M.A. Cortical and subcortical effects of transcutaneous spinal cord stimulation in humans with tetraplegia. *J. Neurosci.* **2020**, *40*, 2633–2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gorodnichev, R.M.; Pivovarova, E.A.; Puhov, A.; Moiseev, S.A.; Savochin, A.A.; Moshonkina, T.R.; Chsherbakova, N.A.; Kilimnik, V.A.; Selionov, V.A.; Kozlovskaya, I.B.; et al. Transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord: A noninvasive tool for the activation of stepping pattern generators in humans. *Hum. Physiol.* **2012**, *38*, 158–167. [[CrossRef](#)]
- Gerasimenko, Y.; Gorodnichev, R.; Puhov, A.; Moshonkina, T.; Savochin, A.; Selionov, V.; Roy, R.R.; Lu, D.C.; Edgerton, V.R. Initiation and modulation of locomotor circuitry output with multisite transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord in noninjured humans. *J. Neurophysiol.* **2015**, *113*, 834–842. [[CrossRef](#)]
- Gerasimenko, Y.; Gorodnichev, R.; Moshonkina, T.; Sayenko, D.; Gad, P.; Edgerton, V.R. Transcutaneous electrical spinal-cord stimulation in humans. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **2015**, *58*, 225–231. [[CrossRef](#)]
- Behrman, A.L.; Ardolino, E.M.; Harkema, S.J. Activity-Based Therapy: From Basic Science to Clinical Application for Recovery after Spinal Cord Injury. In *Proceedings of the Journal of Neurologic Physical Therapy*; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2017; Volume 41, pp. S39–S45.

19. Taccola, G.; Sayenko, D.; Gad, P.; Gerasimenko, Y.; Edgerton, V.R. And yet it moves: Recovery of volitional control after spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.* **2018**, *160*, 64–81. [[CrossRef](#)]
20. Knikou, M. Neural control of locomotion and training-induced plasticity after spinal and cerebral lesions. *Clin. Neurophysiol.* **2010**, *121*, 1655–1668. [[CrossRef](#)]
21. World Medical Association. World Medical Association World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [[CrossRef](#)]
22. Mathiowetz, V.; Volland, G.; Kashman, N.; Weber, K. Adult Norms for the Box and Block Test of Manual Dexterity. *Am. J. Occup. Ther.* **1985**, *39*, 386–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Thomas, C.K.; Johansson, R.S.; Bigland-Ritchie, B. Incidence of F waves in single human thenar motor units. *Muscle Nerve* **2002**, *25*, 77–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Long, J.; Federico, P.; Perez, M.A. A novel cortical target to enhance hand motor output in humans with spinal cord injury. *Brain* **2017**, *140*, 1619–1632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Weber, F. The diagnostic sensitivity of different F wave parameters. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1998**, *65*, 535–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sayenko, D.G.; Atkinson, D.A.; Dy, C.J.; Gurley, K.M.; Smith, V.L.; Angeli, C.; Harkema, S.J.; Edgerton, V.R.; Gerasimenko, Y.P. Spinal segment-specific transcutaneous stimulation differentially shapes activation pattern among motor pools in humans. *J. Appl. Physiol.* **2015**, *118*, 1364–1374. [[CrossRef](#)]
27. Kujirai, T.; Caramia, M.D.; Rothwell, J.C.; Day, B.L.; Thompson, P.D.; Ferbert, A.; Wroe, S.; Asselman, P.; Marsden, C.D. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J. Physiol.* **1993**, *471*, 501–519. [[CrossRef](#)]
28. Gad, P.N.; Kreydin, E.; Zhong, H.; Latack, K.; Edgerton, V.R. Non-invasive Neuromodulation of Spinal Cord Restores Lower Urinary Tract Function after Paralysis. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 432. [[CrossRef](#)]
29. Schättin, A.; Gennaro, F.; Eglhoff, M.; Vogt, S.; de Bruin, E.D. Physical activity, nutrition, cognition, neurophysiology, and short-time synaptic plasticity in healthy older adults: A cross-sectional study. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
30. Chakravarthy, K.; Richter, H.; Christo, P.J.; Williams, K.; Guan, Y. Spinal Cord Stimulation for Treating Chronic Pain: Reviewing Preclinical and Clinical Data on Paresthesia-Free High-Frequency Therapy. *Neuromodulation* **2018**, *21*, 10–18. [[CrossRef](#)]
31. Gandevia, S.C. Spinal and Supraspinal Factors in Human Muscle Fatigue. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1725–1789. [[CrossRef](#)]
32. Burke, R.E.; Edgerton, V.R. Motor unit properties and selective involvement in movement. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **1975**, *3*, 31–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Espiritu, M.G.; Lin, C.S.-Y.; Burke, D. Motoneuron excitability and the F wave. *Muscle Nerve* **2003**, *27*, 720–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yates, S.K.; Brown, W.F. Characteristics of the F response: A single motor unit study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1979**, *42*, 161–170. [[CrossRef](#)]
35. Mesrati, F.; Vecchierini, M.F. F-waves: Neurophysiology and clinical value. *Neurophysiol. Clin.* **2004**, *34*, 217–243. [[CrossRef](#)]
36. Sabbahi, M.A.; Sengul, Y.S. Cervical multisegmental motor responses in healthy subjects. *Spinal Cord* **2012**, *50*, 432–439. [[CrossRef](#)]
37. Milosevic, M.; Masugi, Y.; Sasaki, A.; Sayenko, D.G.; Nakazawa, K. On the reflex mechanisms of cervical transcutaneous spinal cord stimulation in human subjects. *J. Neurophysiol.* **2019**, *121*, 1672–1679. [[CrossRef](#)]
38. Roy, F.D.; Gibson, G.; Stein, R.B. Effect of percutaneous stimulation at different spinal levels on the activation of sensory and motor roots. *Exp. Brain Res.* **2012**, *223*, 281–289. [[CrossRef](#)]
39. Minassian, K.; Persy, I.; Rattay, F.; Dimitrijevic, M.R.; Hofer, C.; Kern, H. Posterior root–muscle reflexes elicited by transcutaneous stimulation of the human lumbosacral cord. *Muscle Nerve* **2007**, *35*, 327–336. [[CrossRef](#)]
40. Pitcher, J.B.; Miles, T.S. Alterations in corticospinal excitability with imposed vs. voluntary fatigue in human hand muscles. *J. Appl. Physiol.* **2002**, *92*, 2131–2138. [[CrossRef](#)]
41. Bestmann, S.; Krakauer, J.W. The uses and interpretations of the motor-evoked potential for understanding behaviour. *Exp. Brain Res.* **2015**, *233*, 679–689. [[CrossRef](#)]
42. Taylor, J.L.; Butler, J.E.; Gandevia, S.C. Changes in muscle afferents, motoneurons and motor drive during muscle fatigue. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2000**, *83*, 106–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hamdy, S.; Rothwell, J.C.; Aziz, Q.; Singh, K.D.; Thompson, D.G. Long-term reorganization of human motor cortex driven by short-term sensory stimulation. *Nat. Neurosci.* **1998**, *1*, 64–68. [[CrossRef](#)]
44. Di Lazzaro, V.; Oliviero, A.; Profice, P.; Pennisi, M.A.; Di Giovanni, S.; Zito, G.; Tonali, P.; Rothwell, J.C. Muscarinic receptor blockade has differential effects on the excitability of intracortical circuits in the human motor cortex. *Exp. Brain Res.* **2000**, *135*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hunter, S.K.; McNeil, C.J.; Butler, J.E.; Gandevia, S.C.; Taylor, J.L. Short-interval cortical inhibition and intracortical facilitation during submaximal voluntary contractions changes with fatigue. *Exp. Brain Res.* **2016**, *234*, 2541–2551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Maruyama, A.; Matsunaga, K.; Tanaka, N.; Rothwell, J.C. Muscle fatigue decreases short-interval intracortical inhibition after exhaustive intermittent tasks. *Clin. Neurophysiol.* **2006**, *117*, 864–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Buccolieri, A.; Abbruzzese, G.; Rothwell, J.C. Relaxation from a voluntary contraction is preceded by increased excitability of motor cortical inhibitory circuits. *J. Physiol.* **2004**, *558*, 685–695. [[CrossRef](#)]
48. Kakulas, B.A.; Kaelan, C. The neuropathological foundations for the restorative neurology of spinal cord injury. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2015**, *129* (Suppl. 1), S1–S7. [[CrossRef](#)]
49. Yu, K.; Rong, W.; Li, J.; Jia, L.; Yuan, W.; Yie, X.; Shi, Z. Neurophysiological evidence of spared upper motor conduction fibers in clinically complete spinal cord injury: Discomplete SCI in rats. *J. Neurol. Sci.* **2001**, *189*, 23–36. [[CrossRef](#)]
50. Smith, A.C.; Knikou, M. A Review on Locomotor Training after Spinal Cord Injury: Reorganization of Spinal Neuronal Circuits and Recovery of Motor Function. *Neural Plast.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]





## PUBLICACIÓN 2

---

Los circuitos neuronales espinales a nivel cervical son susceptibles a cambios plásticos a nivel espinal y cortical producidos por la aplicación combinada de la estimulación eléctrica transcutánea y la actividad física.

Dada la inexistencia de un consenso aún sobre la intensidad idónea para la neuromodulación eficaz de la médula espinal cervical, se propone el siguiente estudio en sujetos sanos, que consta de dos partes. En primer lugar, se estudia el efecto de la variación de intensidad de estimulación eléctrica, al 80, 90 y 110% de la intensidad de corriente que alcance el umbral motor espinal de reposo, mientras se combina con la máxima capacidad de actividad física. En segundo lugar, la estimulación eléctrica se mantiene al 90% de intensidad de la corriente que alcance el umbral motor de reposo, mientras la contracción mantenida durante la actividad física varía del 100 al 50%.

Los resultados mostraron que la estimulación eléctrica subumbral de, como mínimo, el 90% de la intensidad que alcance el umbral motor y combinada con la máxima contracción posible para el agarre manual produce mejoras funcionales y aumento de excitabilidad medular y cortical. El 80% de esta intensidad no es suficiente para provocar cambios significativos. El 110% de esta intensidad modula mejor la excitabilidad cortical, aunque no es tan eficiente como la estimulación subumbral al 90% de la intensidad en el resto de los parámetros funcionales y de excitabilidad medular. La superación del umbral puede inducir un comportamiento diferente del sistema nervioso, para los que se necesitan mayores clarificaciones. En la segunda parte del estudio, el 50% de contracción máxima resulto ser insuficiente para generar cambios positivos en la función motora y excitabilidad espinal o cortical.

Este estudio pretende ofrecer herramientas para optimizar los protocolos de rehabilitación tras una lesión medular, ya que las variaciones de intensidades inciden de forma diferente en las estructuras del sistema nervioso.







Article

# Transcutaneous Electrical Neuromodulation of the Cervical Spinal Cord Depends Both on the Stimulation Intensity and the Degree of Voluntary Activity for Training. A Pilot Study

Hatice Kumru <sup>1,2,3,\*</sup>, María Rodríguez-Cañón <sup>1,4,†</sup>, Victor R. Edgerton <sup>1,5</sup>, Loreto García <sup>1,2,3</sup>, África Flores <sup>4</sup>, Ignasi Soriano <sup>1,2,3</sup>, Eloy Opisso <sup>1,2,3</sup>, Yury Gerasimenko <sup>6,7,8</sup>, Xavier Navarro <sup>1,4</sup>, Guillermo García-Alías <sup>1,4,‡</sup> and Joan Vidal <sup>1,2,3,‡</sup>



**Citation:** Kumru, H.; Rodríguez-Cañón, M.; Edgerton, V.R.; García, L.; Flores, Á.; Soriano, I.; Opisso, E.; Gerasimenko, Y.; Navarro, X.; García-Alías, G.; et al.

Transcutaneous Electrical

Neuromodulation of the Cervical Spinal Cord Depends Both on the Stimulation Intensity and the Degree of Voluntary Activity for Training. A Pilot Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3278. <https://doi.org/10.3390/jcm10153278>

Academic Editors: Ursula S. Hofstoetter and Karen Minassian

Received: 2 June 2021

Accepted: 22 July 2021

Published: 25 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Fundació Institut Guttmann, Institut Universitari de Neurorehabilitació Adscrit a la UAB, 08916 Badalona, Spain; rodriguezcanonmaria@gmail.com (M.R.-C.); vre@ucla.edu (V.R.E.); loretogarcia@guttmann.com (L.G.); isoriano@guttmann.com (I.S.); eopisso@guttmann.com (E.O.); xavier.navarro@uab.cat (X.N.); guillermo.garcia@uab.cat (G.G.-A.); jvidal@guttmann.com (J.V.)
- <sup>2</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain
- <sup>3</sup> Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain
- <sup>4</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia & Insitute of Neuroscience, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; africa.flores@uab.cat
- <sup>5</sup> Department of Neurobiology, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA
- <sup>6</sup> Pavlov Institute of Physiology, 199034 St. Petersburg, Russia; yury.gerasimenko@louisville.edu
- <sup>7</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Louisville, Louisville, KY 40292, USA
- <sup>8</sup> Kentucky Spinal Cord Injury Research Center, University of Louisville, Louisville, KY 40292, USA
- \* Correspondence: hkumru@guttmann.com
- † Equal role as first author.
- ‡ Equal role as senior PI.

**Abstract:** Electrical enabling motor control (eEmc) through transcutaneous spinal cord stimulation offers promise in improving hand function. However, it is still unknown which stimulus intensity or which muscle force level could be better for this improvement. Nine healthy individuals received the following interventions: (i) eEmc intensities at 80%, 90% and 110% of abductor pollicis brevis motor threshold combined with hand training consisting in 100% handgrip strength; (ii) hand training consisting in 100% and 50% of maximal handgrip strength combined with 90% eEmc intensity. The evaluations included box and blocks test (BBT), maximal voluntary contraction (MVC), F wave persistency, F/M ratio, spinal and cortical motor evoked potentials (MEP), recruitment curves of spinal MEP and cortical MEP and short-interval intracortical inhibition. The results showed that: (i) 90% eEmc intensity increased BBT, MVC, F wave persistency, F/M ratio and cortical MEP recruitment curve; 110% eEmc intensity increased BBT, F wave persistency and cortical MEP and recruitment curve of cortical MEP; (ii) 100% handgrip strength training significantly modulated MVC, F wave persistency, F/M wave and cortical MEP recruitment curve in comparison to 50% handgrip strength. In conclusion, eEmc intensity and muscle strength during training both influence the results for neuromodulation at the cervical level.

**Keywords:** transcutaneous spinal cord stimulation; intensity effect; muscle strength effect; hand training; neuromodulation; cervical spinal cord

## 1. Introduction

Transcutaneous spinal cord stimulation (tSCS) used as a method of electrical enabling motor control (eEmc) is a novel, non-invasive method and alone or combined with hand training offers promise in improving hand function since it can modify the functional state of the sensory-motor system [1,2]. eEmc consists of low intensity electrical stimulation applied for changing the physiological states of spinal networks to a level that it enables the spinal network to better respond to voluntary commands and proprioceptive inputs.

In the literature, the different terminologies have been used for transcutaneous spinal cord stimulation: “transcutaneous spinal stimulation (TSS) [3], painless transcutaneous electrical enabling motor control (pcEmc) [4], transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord (TESS)” [5] or “transcutaneous enabling motor control (tEmc)” [6]. Recent developments in therapeutic approaches for spinal cord injury (SCI) showed that tSCS alone [3] or a combination of spinal cord stimulation with pharmacological treatment [7] or with hand training [6,8,9] allowed improving hand motor function in individuals with SCI. It has been hypothesized that spinal electrical stimulation can change the excitability of spinal circuitry and potentially neuromodulate the spinal network to facilitate and enhance the restoration of paralyzed limb function [5–9]. Plastic changes have been also reported in the control of upper limb function in healthy subjects following eEmc alone [5] and combined with hand training [10]. It has been suggested that the mechanisms recruited by eEmc combined with physical training, although partially overlapping, may involve different and perhaps synergistic processes leading to more effective reorganization of neural circuits [10]. It was recently reported that tSCS was capable of facilitating cortically evoked muscle responses and the degree of facilitation progressively increased during the 1 s stimulation training, and was still evident 0.5 s after the end of the training in monkeys [11]. The most likely mechanism of eEmc occurs via transcutaneous tonic spinal activation by elevating spinal networks excitability [12] and may affect interneuronal pathways that generate action potentials on motoneurons within a motor pool in a more normal stochastic time frame [13]. As such, eEmc is hypothesized to potentiate the generation of postsynaptic excitatory potentials and, thus, shift the spinal motor network excitability closer to the excitation threshold. In addition, activation of back musculature under the electrodes of tSCS [11] and of sensory afferents at the level of dorsal roots or via the spinal pathways can contribute to elevating neural excitability [14,15].

According to reports in the literature, there was great variability in the intensity of eEmc applied, though most of the studies used high intensities, close to the participants’ tolerance threshold. In cervical SCI, the stimulus intensity for eEmc varied from below the resting spinal motor threshold (RMT) to an intensity adjusted to enable maximal grip strength or adjusted based on the participant’s functional task performance [5–9]. When eEmc was combined with hand training, variable protocols were used: either maximal handgrip to submaximal isometric hand movement such as squeezing/grasping or standard stretching, active assistive range of motion exercises, intensive gross and fine motor skill training or the intensity that made the task easiest [6,8,9]. All these studies reported significant functional improvement of hand muscle strength and/or neurophysiological changes. We recently showed that even one single session of cervical eEmc is able to modify the excitability of neural networks controlling upper limb function in healthy subjects [10]. These changes strongly depend on the combination of eEmc with hand training, since improved hand grip force and increased spinal and corticospinal output were found in comparison to each intervention tested alone [10]. The intervention consisted in eEmc at an intensity of 90% the RMT at the cervical spinal cord and handgrip training at maximum voluntary contraction (MVC) [10]. However, it remains unknown if the intensity of electrical stimulation for eEmc and the level of hand grip strength in such combined strategy can affect motor strength and/or functional outcome, and if plastic changes occur at spinal or cortical level.

Thus, the objectives of this study were to test: (1) the effect of different electrical stimulation intensities for eEmc combined with the maximum force of hand grip during training, and (2) the effect of different hand grip strength during training combined with 90% of spinal RMT electrical stimulation for eEmc on hand function and spinal cord and cortical excitability. We hypothesized that eEmc at higher stimulus intensity applied at two sites of cervical spinal cord combined with a higher level of hand grip strength can enhance motor strength and functional outcome and eventually modulate spinal or cortical neural circuits more than lower stimulus intensity and lower hand grip strength during training.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Study Design

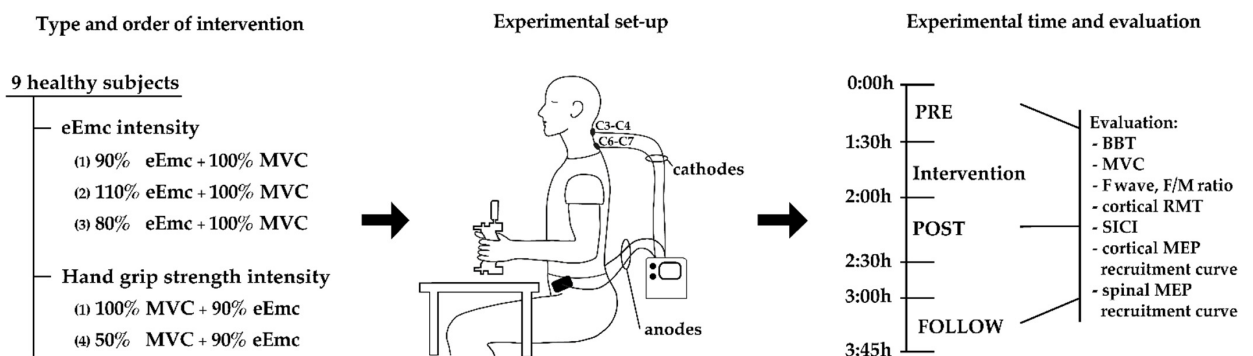
Nine healthy volunteer subjects (age range 25–60 years; mean age  $39.8 \pm 11.1$  years; 3 females and 6 males) participated in the study (Table 1). The inclusion criteria were: age between 18 and 65 years, without any neurological disorder and uncontrolled disease, which could limit the experiment, and given written informed consent. Exclusion criteria were any implanted metallic or electrical devices, and pregnancy. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Institute Guttmann and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

**Table 1.** Demographic data of healthy individuals and current intensities used for cervical stimulation at C3-C4 and at C6-C7 level.

Subject	Sex	Age	Hand	eEmc Intensity Applied during Stimulation (mA)							
				C3-C4				C6-C7			
				% eEmc + 100% MVC			90%eEmc + 50% MVC	%eEmc + 100%MVC			90%eEmc + 50% MVC
80%	90%	110%	80%	90%	110%						
1	M	44	R	32	29	40	29	34	38	44	38
2	M	60	R	69	59	77	63	72	72	90	72
3	F	25	R	27	30	33	29	32	30	40	32
4	F	27	L	32	34	44	34	36	36	46	41
5	F	33	R	37	54	53	47	48	63	62	58
6	M	41	R	27	36	37	31	38	45	42	34
7	M	51	R	51	52	75	63	61	63	90	81
8	M	39	R	48	59	77	49	56	72	88	59
9	M	38	B	45	67	73	61	53	77	75	85

M: male; F: female; L: left; R: right; B: both.

This study was performed in 2 parts. In the first part, we studied the effect of different electrical stimulation intensities for eEmc calculated from the spinal RMT of abductor pollicis brevis (APB) muscle combined with the maximum hand grip strength during training. In the second part, we studied the effect of different handgrip strength levels during training combined with 90% spinal RMT of stimulus intensity for eEmc (Figure 1).



**Figure 1.** Schematic representation of the experiment conditions, order of intervention and the evaluation time points during each experiment, and the functional and motor strength assessment and neurophysiological assessments performed.

### 2.2. Interventions

The study included a total of four interventions, tested in two parts separated at least one week apart. All interventions combined eEmc with hand training. In the first part, we studied the effect of three electrical eEmc stimulation at intensity 80%, 90% and 110% of spinal RMT of the APB muscle, combined with the maximum hand grip strength (100% of

MVC). In the second part, we studied two different levels of hand grip strength for training, 50% and 100% of MVC, combined with eEmc at stimulus intensity of 90% of spinal RMT.

Each intervention consisted of trains of 20 s of concomitant eEmc stimulation and hand training, followed by 80 s of rest, for 30 min. The subject alternated the two hands during eEmc, resulting in nine hand-training attempts for each hand and 18 in total during the whole intervention [10].

The eEmc was delivered through two circular hydrogel adhesive electrodes (2 cm diameter, Axion GmbH, Leonberg, Germany) placed along the midline over spinous processes C3-C4 and C6-C7. eEmc was delivered using biphasic rectangular 1 ms pulses at a frequency of 30 Hz, with each pulse filled with a carrier frequency of 10 kHz [10]. For eEmc, we used two channels of a five-channel current-controlled stimulator of Biostim-5 stimulator (Cosyma Inc., Moscow, Russia) with two pairs of anode and cathode. Each channel was set up independently. Stimulation of the first channel was delivered by a cathode at C3-C4 level and stimulation of the second channel by a cathode at C6-C7, with anodes placed at the iliac crests.

The hand training consisted of holding the hand grip dynamometer and maintaining a hand grip strength of 100% of MVC for all stimulus intensities of eEmc in the first part. In the second part, either 100% (100% MVC) or 50% (50% MVC) of hand grip strength during hand training was combined with eEmc at 90% of stimulus intensity.

### 2.3. Functional and Motor Strength Assessment of the Healthy Participants

The evaluation protocol consisted of two hand functional outcomes, the Box and Block test (BBT) and the measurement of hand grip strength during a MVC with a dynamometer. Neurophysiological assessment was made on the dominant hand and arm muscles. The dominant hand was determined according to the Edinburgh inventory [16]. F-wave and spinal motor evoked potentials (spinal MEPs) in response to single-pulse C3-C4 and C6-C7 tSCS were recorded in the APB muscle to study the spinal cord excitability. At the cortical level, using transcranial magnetic stimulation (TMS), we determined the cortical RMT of APB muscle, and recorded cortical motor evoked potentials (cortical MEPs), short-interval intracortical inhibition (SICI) and recruitment curve of cortical MEPs. The neurophysiological studies were performed with an EMG machine (Medelec Synergy, Oxford Instruments; Surrey, England). The evaluation protocol was repeated at three time points: before (PRE), just after (POST) and one hour after finishing the intervention (FOLLOW) in each subject and experimental study (Figure 1). The total duration of each experiment was around four hours.

#### 2.3.1. Box and Block Test (BBT)

The BBT was used to assess hand dexterity. The participant was seated in front of a box split in two halves, the one on the preferred side full of small cube-shaped blocks [17]. The subject had to move the blocks one by one to the other side, crossing the middle line, during 60 s. The total number of moved blocks was the BBT score.

#### 2.3.2. Maximum Voluntary Contraction (MVC) during Hand Grip

The participant was seated in front of a table, with the dominant forearm resting on it in neutral position, holding a dynamometer (Jamar Model 5030J1, Sammons Preston, NJ, USA) with the hand. For trigger signal, we used a mild electric stimulus (3 mA intensity with pulse width 0.5 ms) delivered by means of ring electrodes around the fifth finger. Following the trigger signal, the participant had to perform a MVC and maintain it during 4 s; the strength was measured in kilograms (kg) in three consecutive trials, with at least one minute rest between them.

### 2.4. Neurophysiological Assessment

Disposable adhesive surface electrodes (outer diameter 20 mm; Technomed, Maastricht Airport, Netherlands) were placed over the muscle belly of the APB, abductor digiti

minimi (ADM), flexor carpi radialis (FCR), extensor digitorum (ED) and biceps brachii (BB) muscles of the dominant arm, with the cathode proximal and the anode approximately 2 cm distally after standard skin preparation. The EMG signal was amplified, filtered using band-pass of 30 Hz–10 kHz, and epochs of 100 ms sweep duration at amplitude sensitivity of 0.1–0.5 mV recorded at a sampling rate of 50 kHz. EMG activity was visualized online, with the subject relaxing her/his arm and hand. If any background EMG activity was observed after stimulus delivery, the recording was discarded, and the stimulation was repeated. Offline analysis was performed with MATLAB.

#### 2.4.1. F Wave Persistency and F/M Wave Ratio

Suprathreshold electrical stimulation (pulse width 0.5 ms) of the median nerve at the wrist was used to elicit the maximum M wave and F wave in the APB muscle for at least 15 recordings. We assessed spinal motoneuron excitability using F-wave persistency and the Fmax/Mmax ratio (F/M ratio) in the APB muscle.

#### 2.4.2. Spinal MEP

Stimulation was delivered using two hydrogel adhesive disk electrodes (20 mm diameter; Axion GmbH, Germany) as cathodes along the midline between spinous processes C3-C4 and C6-C7. The anodes were two adhesive rectangular electrodes (5 × 12 cm) placed symmetrically over the iliac crest. Monophasic rectangular single pulses of 1 ms duration were delivered from a Biostim-5 stimulator (Cosyma Inc., Moscow, Russia). The spinal RMT was calculated as the lowest intensity of electrical stimulation applied first at C3-C4 and then at C6-C7 that evoked a spinal MEP of  $\geq 50$   $\mu$ V peak-to-peak amplitude in the APB muscle in at least 5 of 10 consecutive trials. Then, the recruitment of spinal MEPs on all the muscles tested was recorded for each stimulation site and time point. Recruitment curves of spinal MEPs were derived from responses to gradually increasing stimulation intensity from 90% to 150% of the baseline spinal RMT at 10% increments, with three repetitions at each intensity.

#### 2.4.3. Transcranial Magnetic Stimulation (TMS)

A Magstim<sup>®</sup> BiStim<sup>2</sup> TMS (Magstim Company, Whitland, Wales, UK) apparatus was used. A figure-of-eight coil was held tangentially to the scalp over the motor area of the dominant hand in the optimal position for activating the APB in a posterior-anterior current direction. The hot point was defined as a point over the scalp where the largest amplitude cortical MEP in APB muscle was recorded. Subjects were seated in a chair, resting their pronated forearms on a desk in front of them and were asked to stay relaxed but awake throughout the test.

#### 2.4.4. Neurophysiological Parameters

We recorded the following parameters pre and post intervention (1) the BBT score to evaluate hand dexterity and (2) the MVC for handgrip strength. To evaluate spinal cord excitability changes: (1) F wave persistency and F/M wave ratio; (2) recruitment curve of spinal MEP. To evaluate cortical excitability changes: (1) cortical RMT, defined as the lowest intensity of TMS that evoked a cortical MEP of  $\geq 50$   $\mu$ V peak-to-peak amplitude in the APB muscle in at least 5 of 10 consecutive trials; (2) mean amplitude of cortical MEPs using single-pulse TMS at 120% of cortical RMT of APB in 5 recordings; (3) short intracortical inhibition (SICI) using paired-pulse TMS with a subthreshold conditioning stimulus (80% of cortical RMT) and a suprathreshold test stimulus (120% of cortical RMT) at interstimulus interval of 2 ms in 5 recordings without background activity [18]; (4) recruitment curves of cortical MEP obtained at increasing intensities from 90% to 150% of cortical RMT of APB, at 10% increments (three recordings at each intensity). The absence of baseline EMG activity was verified before carrying out each of the recordings; between 1 to 6 recordings for each subject were rejected because of background activity.

### 2.5. Data Analysis and Statistics

All data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), at baseline (PRE), just after (POST) and sixty minutes after finishing the intervention (FOLLOW) in each condition. We calculated the % changes with respect to baseline for each time point evaluation when appropriate. In the analysis of the recruitment curves, differences between pre vs. post intervention, and vs. follow were calculated. BBT was calculated just from one trial and MVC (hand muscle strength) was calculated as the mean of 3 trials.

For the F wave, the peak-to-peak amplitude and for Mmax, the maximum amplitude of the M wave was measured. F wave was considered if peak-to-peak amplitude was at least 1% of M wave (Mmax) amplitude. F wave persistence was calculated by dividing the number of F responses by the number of stimuli from 15 recordings. The maximum amplitude of F wave was normalized to Mmax amplitude to obtain Fmax/Mmax ratio.

For recruitment curves of spinal MEPs and cortical MEPs, we measured the peak-to-peak MEP amplitude in each recording, and then calculated the mean amplitude of MEPs from 3 recordings for each intensity and for each subject and for each experimental condition. Recruitment curves obtained at post and follow-up were normalized calculating the amplitude difference according to pre intervention recruitment curves values.

For SICI, averaged peak-to-peak amplitude of the conditioned MEP (obtained after the conditioning stimulus of 80% cortical RMT) was expressed as a percentage of the average amplitude of the test MEP (obtained at supramaximal 120% cortical RMT stimulus), according to % = (conditioned MEP/test MEP) \* 100.

Shapiro–Wilk test was used to assess if data were normally distributed, and sphericity was evaluated with Mauchly's test. Greenhouse–Geisser correction was used when the assumption of sphericity was violated ( $p < 0.05$ ). All data was normally distributed, and a two-way repeated measures ANOVA (RM-ANOVA) was used for all statistical analyses to study the main effects of intervention and time on the functional and motor strength assessment and neurophysiological assessments for the raw and the normalized data. Interaction effect was also studied to determine if the interaction between intervention and time factors could affect the dependent variable. For significant interaction in the normalized data, time point and intervention simple effects were calculated and shown in results and figures. Time point multiple comparisons were performed with the Dunnett test (comparison between baseline vs. post and baseline vs. follow-up). The intervention multiple comparisons were compared with the Tukey test for the first part of the study (three interventions) and with Šidák test for the second part (two interventions). Significance level was set at  $p < 0.05$  in all cases. Posterior estimation effect size  $\eta^2$  was calculated (0.01, 0.06,  $>0.14$  as small, medium and large effect respectively).

## 3. Results

Demographic data of healthy individuals and used intensities for eEmc are given in Table 1. All volunteers finished the four experimental interventions with some discomfort sensation subjectively reported but not quantified, especially for the higher intensities during cervical stimulation, on the neck around the electrodes and slight extension of the neck because of cervical paravertebral muscle contraction.

### 3.1. Effects of eEmc Intensity

Raw data of functional and motor strength and neurophysiological assessment during the different electrical stimulus intensity for eEmc, in the first part of the study, are shown in Table 2.

**Table 2.** Raw data and statistics of functional and motor strength and neurophysiological assessment during the electrical stimulus intensity for eEmc at 80%, 90% and 110% combined with maximum (100%) handgrip strength during hand training.

	Time	80%	90%	110%	F (DFn, DFd)	p Value	η <sup>2</sup>
BBT (blocks number)	Pre	74.1 ± 3.0	72.8 ± 3.1	71.2 ± 2.7	Ftime (2, 16) = 17.32	<0.0001	0.033
	Post	74.6 ± 3.1	75.7 ± 3.5	74.4 ± 2.9	Finterven. (2, 16) = 0.16	0.855	0.002
	Foll.	74.6 ± 3.2	77.4 ± 3.4	78.0 ± 2.7	Finterac. (4, 32) = 3.49	0.018	0.014
MVC Grip Force (kg)	Pre	37.8 ± 8.3	31.3 ± 11.3	36.9 ± 7.6	Ftime (2, 16) = 5.87	0.012	0.002
	Post	35.1 ± 7.6	32.7 ± 11.0	35.5 ± 8.7	Finterven. (2, 16) = 3.59	0.052	0.040
	Foll.	35.8 ± 9.2	33.6 ± 9.8	36.4 ± 7.5	Finterac. (4, 32) = 2.71	0.048	0.009
F wave Persistency	Pre	65.4 ± 7.9	48.8 ± 9.1	71.5 ± 6.5	Ftime (2, 16) = 0.33	0.725	0.002
	Post	59.3 ± 8.5	60.2 ± 8.2	59.7 ± 8.0	Finterven. (2, 16) = 3.33	0.062	0.019
	Foll.	59.9 ± 9.5	57.9 ± 9.2	60.2 ± 10.1	Finterac. (4, 32) = 2.92	0.031	0.031
Mmax wave (microV)	Pre	13,296.3 ± 1754.9	16,829.0 ± 1863.2	16,844.5 ± 1204.9	Ftime (2, 16) = 1.77	0.202	0.018
	Post	12,752.8 ± 1427.5	15,485.3 ± 1937.6	16,234.6 ± 1579.3	Finterven. (2, 16) = 4.85	0.023	0.119
	Foll.	13,697.6 ± 1726.9	17,153.6 ± 1889.8	18,452.1 ± 970.3	Finterac. (4, 32) = 0.29	0.882	0.003
Ratio Fmax/Mmax	Pre	5.5 ± 0.8	3.7 ± 0.8	4.2 ± 0.6	Ftime (1.92, 15.33) = 0.15	0.851	0.001
	Post	4.6 ± 0.7	5.0 ± 0.8	4.5 ± 0.5	Finterven. (1.38, 11.03) = 0.55	0.530	0.008
	Foll.	4.2 ± 0.6	4.3 ± 0.7	5.4 ± 0.6	Finterac. (1.83, 14.64) = 1.93	0.082	0.069
RMT TMS	Pre	38.7 ± 2.3	39.1 ± 2.6	39.1 ± 2.0	Ftime (1.85, 14.81) = 1.46	0.263	0.002
	Post	37.8 ± 2.4	37.8 ± 2.4	39.3 ± 2.5	Finterven. (1.89, 15.14) = 0.21	0.805	0.002
	Foll.	38.2 ± 2.4	39.1 ± 2.6	38.4 ± 2.0	Finterac. (1.91, 15.31) = 1.46	0.263	0.003
SICI in APB (%)	Pre	13.1 ± 3.7	13.8 ± 2.9	8.3 ± 1.2	Ftime (1.13, 9.05) = 0.93	0.374	0.021
	Post	10.8 ± 2.6	12.4 ± 4.2	7.1 ± 2.6	Finterven. (1.51, 12.07) = 0.14	0.816	0.003
	Follow	13.2 ± 4.2	16.7 ± 4.7	11.2 ± 4.1	Finterac. (1.90, 15.21) = 0.34	0.708	0.010
Cortical MEP at 120% RMT in APB (mV)	Pre	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	Ftime (2, 16) = 3.43	0.058	0.091
	Post	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.2	Finterven. (2, 16) = 5.25	0.018	0.056
	Foll.	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3	Finterac. (4, 32) = 4.99	0.003	0.113
<b>Stimulus Intensity</b>		<b>80%</b>	<b>90%</b>	<b>110%</b>			
TMS recruitment: diff post-pre (mV)	0.9	-0.002 ± 0.08	0.08 ± 0.11	0.04 ± 0.08	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 10.69 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.74 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 2.17	<0.001	0.121
	1	0.06 ± 0.20	0.13 ± 0.37	-0.04 ± 0.47			
	1.1	-0.08 ± 0.68	0.14 ± 0.80	0.16 ± 0.77			
	1.2	0.004 ± 0.71	0.37 ± 1.20	0.68 ± 1.14			
	1.3	0.62 ± 0.96	0.07 ± 1.02	0.12 ± 1.00			
	1.4	0.124 ± 0.90	0.91 ± 1.21	1.03 ± 0.71			
TMS recruitment: diff foll-pre (mV)	0.9	-0.01 ± 0.06	-0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.09	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 4.09 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 3.61 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 3.73	0.002	0.078
	1	0.05 ± 0.28	-0.01 ± 0.25	0.17 ± 0.80			
	1.1	-0.16 ± 0.46	-0.10 ± 0.43	0.43 ± 1.18			
	1.2	0.17 ± 0.61	0.20 ± 0.59	0.88 ± 1.15			
	1.3	-0.20 ± 0.66	0.39 ± 0.65	-0.01 ± 1.03			
	1.4	0.13 ± 1.14	0.34 ± 0.72	1.24 ± 0.70			
C3-C4 recruitment: diff post-pre (mV)	0.9	0.02 ± 0.07	-0.004 ± 0.01	0.01 ± 0.02	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 0.96 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.99 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 1.69	0.460	0.023
	1	0.01 ± 0.09	-0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.05			
	1.1	0.01 ± 0.04	-0.03 ± 0.11	0.001 ± 0.03			
	1.2	0.01 ± 0.03	-0.04 ± 0.11	0.004 ± 0.02			
	1.3	-0.03 ± 0.09	-0.04 ± 0.11	-0.01 ± 0.03			
	1.4	0.03 ± 0.09	-0.06 ± 0.11	0.01 ± 0.04			
C3-C4 recruitment: diff foll-pre (mV)	0.9	0.03 ± 0.09	0.02 ± 0.05	0.01 ± 0.02	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 0.31 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.78 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 1.10	0.929	0.008
	1	0.02 ± 0.09	-0.01 ± 0.03	0.04 ± 0.10			
	1.1	0.01 ± 0.05	-0.002 ± 0.11	0.01 ± 0.02			
	1.2	0.02 ± 0.05	0.004 ± 0.02	0.02 ± 0.03			
	1.3	0.03 ± 0.04	0.01 ± 0.02	0.001 ± 0.03			
	1.4	0.04 ± 0.08	-0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.03			
C6-C7 recruitment: diff post-pre (mV)	0.9	0.003 ± 0.03	-0.001 ± 0.03	0.01 ± 0.02	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 2.14 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.67 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 0.51	0.066	0.041
	1	-0.001 ± 0.03	0.04 ± 0.10	0.01 ± 0.03			
	1.1	0.004 ± 0.02	-0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.03			
	1.2	-0.03 ± 0.09	-0.01 ± 0.06	-0.01 ± 0.03			
	1.3	-0.04 ± 0.11	-0.02 ± 0.04	0.001 ± 0.05			
	1.4	-0.03 ± 0.08	-0.01 ± 0.05	-0.004 ± 0.05			
C6-C7 recruitment: diff foll-pre (mV)	0.9	0.01 ± 0.02	-0.004 ± 0.03	0.02 ± 0.02	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 0.40 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.16 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 0.72	0.878	0.010
	1	-0.0004 ± 0.03	0.03 ± 0.09	0.02 ± 0.02			
	1.1	0.01 ± 0.02	-0.001 ± 0.04	0.02 ± 0.04			
	1.2	-0.02 ± 0.10	0.01 ± 0.02	0.003 ± 0.03			
	1.3	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.02	-0.02 ± 0.08			
	1.4	0.01 ± 0.09	0.004 ± 0.03	0.004 ± 0.04			
1.5	-0.01 ± 0.14	0.002 ± 0.02	0.03 ± 0.06				

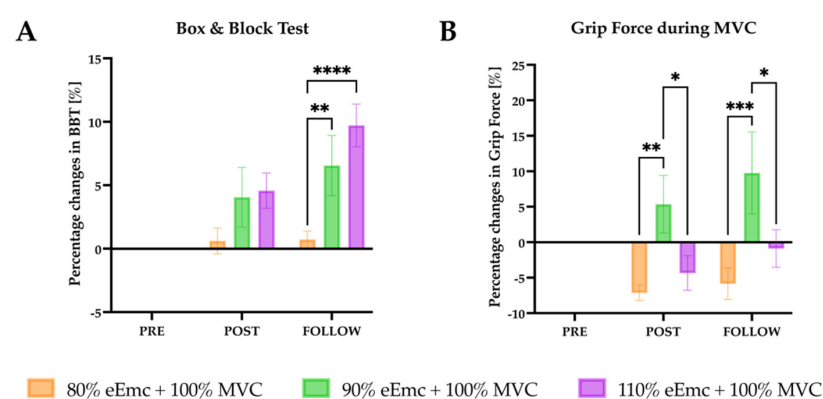
diff post-pre: differences between post-pre evaluation; diff foll-pre: differences between baseline-follow up evaluation.



### 3.1.1. Functional and Motor Strength Assessment

**Box and Block test.** There was a significant effect of time and interaction in the raw data (Table 2) and an effect of time, intervention and interaction in the normalized data. The percentage change of number of boxes during follow-up was significantly higher for 90% and 110% intensity of eEmc with respect to 80% (Figure 2A).

**Grip force during MVC.** RM-ANOVA showed significant effect of the time and interaction in the raw data; and effect of time, intervention and interaction in the normalized data. Intervention simple effect in percentage changes of MVC showed higher maximum muscle grip strength with 90% intensity of eEmc than with 110% and 80% at post intervention and follow-up time points (Figure 2B).



**Figure 2.** Functional and motor outcomes assessed by the Box and Block test and MVC. (A) percentage changes in the number of blocks moved in the Box and Block test with respect to baseline. Intervention simple effect shows significant differences at follow of 90% (\*\*  $p = 0.004$ ) and 110% eEmc (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) with respect to 80% eEmc; (B) percentage changes in MVC with respect to baseline. Intervention simple effect showed differences of 90% eEmc compared with 80% (\*\*  $p = 0.0026$ ) and 110% eEmc at post (\*  $p = 0.0211$ ) and follow (\*\*\*  $p = 0.0108$ ; \*  $p = 0.0002$ ) time points.

### 3.1.2. Neurophysiological Assessment

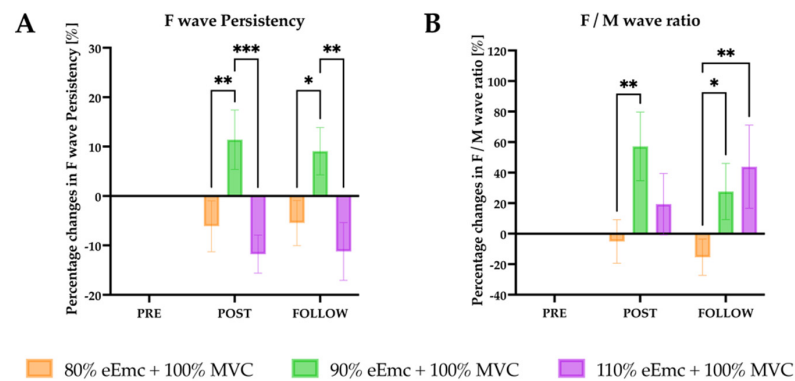
**F-wave.** There was a significant effect of interaction on the persistence of the F wave in the raw data. The percentage change of F wave persistency was significantly higher for 90% of eEmc intensity at post intervention in comparison with 80% and 110%, and at follow-up in both 90% and 110% in comparison with 80% (Figure 3A).

For Mmax wave, RM-ANOVA showed significant effect of intervention in the raw data, but the percentage change of Mmax amplitude did not show any significant effect. On the other hand, the normalized Fmax/Mmax ratio showed significant effect of interaction. It was significantly higher with 90% of eEmc in comparison with 80% at post intervention; and with 90% and 110% in comparison with 80% of eEmc at follow-up evaluation (Figure 3B).

**Spinal MEPs recruitment curve.** RM-ANOVA showed no significant differences in the raw or the normalized data regarding results of the recruitment curve of spinal MEPs at C3-C4 or at C6-C7 level.

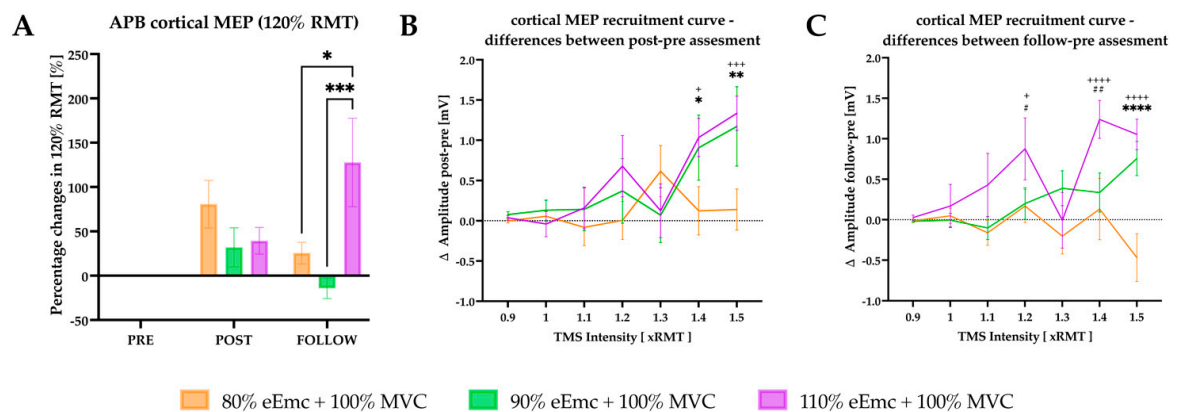
**Cortical RMT, TMS-induced cortical MEPs and SICI.** Cortical RMT and SICI did not change significantly at any eEmc stimulation intensity ( $p > 0.05$ ) neither in the raw nor in the normalized data.

For the TMS-induced cortical MEPs at 120% of RMT, RM-ANOVA showed significant effect of intervention and interaction in the raw data. However, there was significant effect of time, intervention and interaction in the normalized data. According to intervention simple effect, the percentage change of MEP amplitude was significantly higher at 110% of eEmc with respect to 80% and to 90% at follow-up (Figure 4A).



**Figure 3.** F wave persistency and F/M wave ratio. (A) percentage changes in F wave persistency with respect to baseline. Intervention simple effect showed significant differences of 90% eEmc with respect to 80% (\*\*  $p = 0.0079$ ) and 110% eEmc (\*\*\*)  $p = 0.0005$ ) at post and at follow (\*  $p = 0.0304$ ; \*\*  $p = 0.0020$ ); (B) percentage changes in F/M ratio with respect to baseline. Intervention simple effect showed significant differences at post of 90% and 80% eEmc (\*\*  $p = 0.0032$ ); and at follow of 80% eEmc and 90% (\*  $p = 0.0491$ ) and 110% eEmc (\*\*  $p = 0.0051$ ).

For recruitment curves of cortical MEP, there was a significant effect of intensity and interaction for difference between pre and post, and an effect of interaction for difference between pre and follow-up. We found a significantly higher MEP amplitude with 90% and 110% of eEmc compared with 80% at post intervention (Figure 4B). The MEP amplitude was significantly higher at follow-up testing in 90% and 110% of eEmc with respect to 80% for 1.4× and 1.5 × RMT (Figure 4C), and in 110% with respect to 80% and 90% of eEmc for 1.1 × RMT (Figure 4C).



**Figure 4.** Cortical excitability outcomes. (A) percentage changes in cortical MEP evoked by TMS 120% of RMT with respect to baseline. Intervention simple effect showed significant differences at follow of 110% eEmc with respect to 80% (\*  $p = 0.0126$ ) and 90% eEmc (\*\*\*)  $p = 0.0005$ ); (B) difference in cortical MEP amplitude between post and pre time points. Intensity simple effects showed significant differences of 80% eEmc with respect 90% and 110% of eEmc at 1.4 (\*  $p = 0.0390$ , +  $p = 0.0133$ ) and 1.5 (\*\*  $p = 0.0042$ , +++  $p = 0.0008$ ) RMT cortical MEP; (C) difference in cortical MEP amplitude between follow and pre time points. Intensity simple effects showed significant differences of 80% and 110% eEmc at 1.2 (+  $p = 0.0162$ ), 1.4 (++++  $p < 0.0001$ ) and 1.5 RMT (++++  $p < 0.0001$ ); and of 90% and 110% eEmc at 1.2 (#  $p < 0.0225$ ) and 1.4 RMT multiple (##  $p = 0.0015$ ); and of 80% and 90% eEmc at 1.5 (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) RMT multiple.

### 3.2. Effects of Hand Grip Force during Training

Raw data of functional and motor strength assessment and neurophysiological assessments during the second part of the study, evaluating different hand grip strength levels for training, combined with a fixed eEMC intensity, are shown in Table 3.

**Table 3.** Raw data and statistics of functional and motor strength and neurophysiological assessment during 100% or 50% of hand grip strength during hand training combined with the 90% of electrical stimulus intensity for eEmc.

	Time	80%	90%	110%	F (DFn, DFd)	p Value	η <sup>2</sup>
BBT (blocks number)	Pre	74.1 ± 3.0	72.8 ± 3.1	71.2 ± 2.7	Ftime (2, 16) = 17.32	<0.0001	0.033
	Post	74.6 ± 3.1	75.7 ± 3.5	74.4 ± 2.9	Finterven. (2, 16) = 0.16	0.855	0.002
	Foll.	74.6 ± 3.2	77.4 ± 3.4	78.0 ± 2.7	Finterac. (4, 32) = 3.49	0.018	0.014
MVC Grip Force (kg)	Pre	37.8 ± 8.3	31.3 ± 11.3	36.9 ± 7.6	Ftime (2, 16) = 5.87	0.012	0.002
	Post	35.1 ± 7.6	32.7 ± 11.0	35.5 ± 8.7	Finterven. (2, 16) = 3.59	0.052	0.040
	Foll.	35.8 ± 9.2	33.6 ± 9.8	36.4 ± 7.5	Finterac. (4, 32) = 2.71	0.048	0.009
F wave Persistency	Pre	65.4 ± 7.9	48.8 ± 9.1	71.5 ± 6.5	Ftime (2, 16) = 0.33	0.725	0.002
	Post	59.3 ± 8.5	60.2 ± 8.2	59.7 ± 8.0	Finterven. (2, 16) = 3.33	0.062	0.019
	Foll.	59.9 ± 9.5	57.9 ± 9.2	60.2 ± 10.1	Finterac. (4, 32) = 2.92	0.031	0.031
Mmax wave (microV)	Pre	13,296.3 ± 1754.9	16,829.0 ± 1863.2	16,844.5 ± 1204.9	Ftime (2, 16) = 1.77	0.202	0.018
	Post	12,752.8 ± 1427.5	15,485.3 ± 1937.6	16,234.6 ± 1579.3	Finterven. (2, 16) = 4.85	0.023	0.119
	Foll.	13,697.6 ± 1726.9	17,153.6 ± 1889.8	18,452.1 ± 970.3	Finterac. (4, 32) = 0.29	0.882	0.003
Ratio Fmax/Mmax	Pre	5.5 ± 0.8	3.7 ± 0.8	4.2 ± 0.6	Ftime (1.92, 15.33) = 0.15	0.851	0.001
	Post	4.6 ± 0.7	5.0 ± 0.8	4.5 ± 0.5	Finterven. (1.38, 11.03) = 0.55	0.530	0.008
	Foll.	4.2 ± 0.6	4.3 ± 0.7	5.4 ± 0.6	Finterac. (1.83, 14.64) = 1.93	0.082	0.069
RMT TMS	Pre	38.7 ± 2.3	39.1 ± 2.6	39.1 ± 2.0	Ftime (1.85, 14.81) = 1.46	0.263	0.002
	Post	37.8 ± 2.4	37.8 ± 2.4	39.3 ± 2.5	Finterven. (1.89, 15.14) = 0.21	0.805	0.002
	Foll.	38.2 ± 2.4	39.1 ± 2.6	38.4 ± 2.0	Finterac. (1.91, 15.31) = 1.46	0.263	0.003
SICI in APB (%)	Pre	13.1 ± 3.7	13.8 ± 2.9	8.3 ± 1.2	Ftime (1.13, 9.05) = 0.93	0.374	0.021
	Post	10.8 ± 2.6	12.4 ± 4.2	7.1 ± 2.6	Finterven. (1.51, 12.07) = 0.14	0.816	0.003
	Follow	13.2 ± 4.2	16.7 ± 4.7	11.2 ± 4.1	Finterac. (1.90, 15.21) = 0.34	0.708	0.010
Cortical MEP at 120% RMT in APB (mV)	Pre	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	Ftime (2, 16) = 3.43	0.058	0.091
	Post	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.2	Finterven. (2, 16) = 5.25	0.018	0.056
	Foll.	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3	Finterac. (4, 32) = 4.99	0.003	0.113
<b>Stimulus Intensity</b>		<b>80%</b>	<b>90%</b>	<b>110%</b>			
TMS recruitment: diff post-pre (mV)	0.9	-0.002 ± 0.08	0.08 ± 0.11	0.04 ± 0.08	Fintensity (6, 48) = 10.69 Finterven. (2, 16) = 0.74 Finterac. (12, 96) = 2.17	<0.001	0.121
	1	0.06 ± 0.20	0.13 ± 0.37	-0.04 ± 0.47			
	1.1	-0.08 ± 0.68	0.14 ± 0.80	0.16 ± 0.77			
	1.2	0.004 ± 0.71	0.37 ± 1.20	0.68 ± 1.14			
	1.3	0.62 ± 0.96	0.07 ± 1.02	0.12 ± 1.00			
	1.4	0.124 ± 0.90	0.91 ± 1.21	1.03 ± 0.71			
	1.5	0.14 ± 0.77	1.17 ± 1.48	1.34 ± 0.64			
TMS recruitment: diff foll-pre (mV)	0.9	-0.01 ± 0.06	-0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.09	Fintensity (6, 48) = 4.09 Finterven. (2, 16) = 3.61 Finterac. (12, 96) = 3.73	0.002	0.078
	1	0.05 ± 0.28	-0.01 ± 0.25	0.17 ± 0.80			
	1.1	-0.16 ± 0.46	-0.10 ± 0.43	0.43 ± 1.18			
	1.2	0.17 ± 0.61	0.20 ± 0.59	0.88 ± 1.15			
	1.3	-0.20 ± 0.66	0.39 ± 0.65	-0.01 ± 1.03			
	1.4	0.13 ± 1.14	0.34 ± 0.72	1.24 ± 0.70			
	1.5	-0.47 ± 0.88	0.76 ± 0.63	1.05 ± 0.57			
C3-C4 recruitment: diff post-pre (mV)	0.9	0.02 ± 0.07	-0.004 ± 0.01	0.01 ± 0.02	Fintensity (6, 48) = 0.96 Finterven. (2, 16) = 0.99 Finterac. (12, 96) = 1.69	0.460	0.023
	1	0.01 ± 0.09	-0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.05			
	1.1	0.01 ± 0.04	-0.03 ± 0.11	0.001 ± 0.03			
	1.2	0.01 ± 0.03	-0.04 ± 0.11	0.004 ± 0.02			
	1.3	-0.03 ± 0.09	-0.04 ± 0.11	-0.01 ± 0.03			
	1.4	0.03 ± 0.09	-0.06 ± 0.11	0.01 ± 0.04			
	1.5	0.04 ± 0.10	-0.003 ± 0.09	-0.02 ± 0.04			
C3-C4 recruitment: diff foll-pre (mV)	0.9	0.03 ± 0.09	0.02 ± 0.05	0.01 ± 0.02	Fintensity (6, 48) = 0.31 Finterven. (2, 16) = 0.78 Finterac. (12, 96) = 1.10	0.929	0.008
	1	0.02 ± 0.09	-0.01 ± 0.03	0.04 ± 0.10			
	1.1	0.01 ± 0.05	-0.002 ± 0.11	0.01 ± 0.02			
	1.2	0.02 ± 0.05	0.004 ± 0.02	0.02 ± 0.03			
	1.3	0.03 ± 0.04	0.01 ± 0.02	0.001 ± 0.03			
	1.4	0.04 ± 0.08	-0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.03			
	1.5	0.06 ± 0.08	0.001 ± 0.04	0.01 ± 0.03			

Table 3. Cont.

	Time	80%	90%	110%	F (DFn, DFd)	p Value	$\eta^2$
C6-C7 recruitment: diff post-pre (mV)	0.9	0.003 ± 0.03	-0.001 ± 0.03	0.01 ± 0.02	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 2.14 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.67 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 0.51	0.066 0.525 0.906	0.041 0.023 0.023
	1	-0.001 ± 0.03	0.04 ± 0.10	0.01 ± 0.03			
	1.1	0.004 ± 0.02	-0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.03			
	1.2	-0.03 ± 0.09	-0.01 ± 0.06	-0.01 ± 0.03			
	1.3	-0.04 ± 0.11	-0.02 ± 0.04	0.001 ± 0.05			
	1.4	-0.03 ± 0.08	-0.01 ± 0.05	-0.004 ± 0.05			
1.5	-0.02 ± 0.12	0.01 ± 0.04	0.01 ± 0.06				
C6-C7 recruitment: diff foll-pre (mV)	0.9	0.01 ± 0.02	-0.004 ± 0.03	0.02 ± 0.02	F <sub>intensity</sub> (6, 48) = 0.40 F <sub>interven.</sub> (2, 16) = 0.16 F <sub>interac.</sub> (12, 96) = 0.72	0.878 0.850 0.725	0.010 0.005 0.039
	1	-0.0004 ± 0.03	0.03 ± 0.09	0.02 ± 0.02			
	1.1	0.01 ± 0.02	-0.001 ± 0.04	0.02 ± 0.04			
	1.2	-0.02 ± 0.10	0.01 ± 0.02	0.003 ± 0.03			
	1.3	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.02	-0.02 ± 0.08			
	1.4	0.01 ± 0.09	0.004 ± 0.03	0.004 ± 0.04			
1.5	-0.01 ± 0.14	0.002 ± 0.02	0.03 ± 0.06				

diff post-pre: differences between post-pre evaluation; diff foll-pre: differences between baseline-follow up evaluation.

### 3.2.1. Functional and Motor Strength Assessment

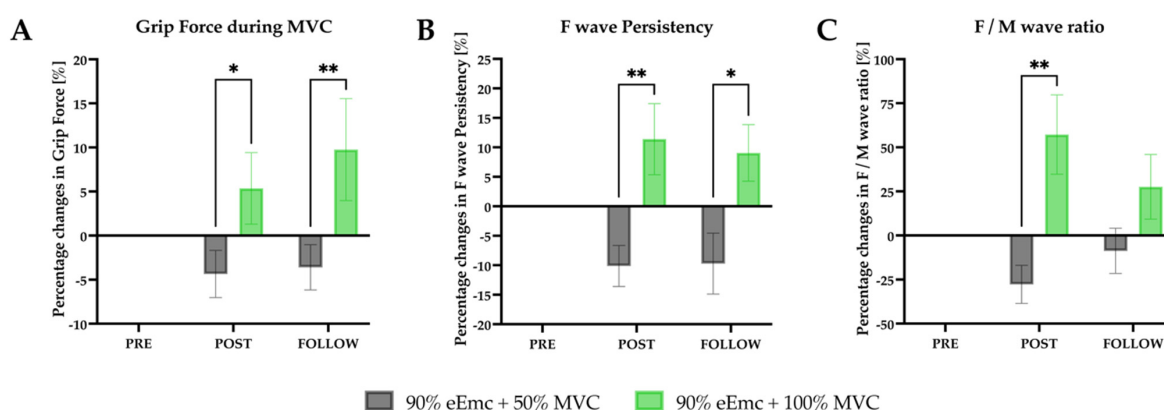
*Box and Block test.* RM-ANOVA showed an effect of time and interaction in the raw data (Table 3), and only of time in the normalized data. The percentage of BBT changes was not significant between 50% vs. 100% handgrip strength condition.

*Grip force during MVC.* RM-ANOVA showed an effect of intervention and interaction in the raw and in the normalized data (Table 3). The percentage of MVC increased significantly in 100% handgrip strength condition compared with 50% at post intervention and at follow-up (Figure 5A).

### 3.2.2. Neurophysiological Assessment

*F-wave persistence.* RM-ANOVA showed effect of interaction in the raw data, and effect of intervention and interaction in the normalized data. According to intervention simple effects, the percentage of F wave persistency increased significantly with 100% hand grip strength compared to 50% at post intervention and follow-up (Figure 5B).

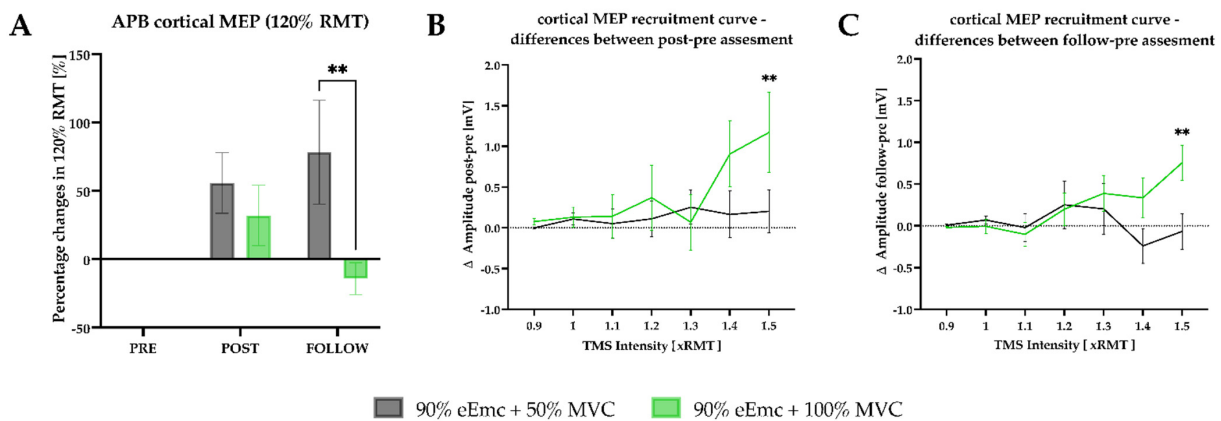
*F/M wave ratio.* RM-ANOVA showed no effect in the raw data but showed significant effect of intervention and interaction in the normalized data. There was a significantly higher ratio with 100% of handgrip strength intervention than with 50% at post intervention (Figure 5C).



**Figure 5.** Changes in MVC, F wave persistency and F/M wave ratio. (A) percentage changes in grip force during MVC according to baseline. Intervention simple effect showed differences at post (\*  $p = 0.0144$ ) and follow (\*\*  $p = 0.0011$ ); (B) percentage changes in F wave persistency according to baseline. Intervention simple effects showed significant differences at post (\*\*  $p = 0.0073$ ) and follow (\*  $p = 0.0191$ ); (C) percentage changes in F/M ratio according to baseline. Intervention simple effect showed significant differences at post (\*\*  $p = 0.0016$ ).

*Spinal MEPs recruitment curve.* RM-ANOVA did not show any significant differences in raw and normalized data of the recruitment curve of spinal MEP evoked with stimulation either at C3-C4 or C6-C7 ( $p > 0.05$ ).

*Cortical RMT, TMS-induced cortical MEPs and SIC1.* RM-ANOVA showed significant effect of time in the raw and in the normalized data for cortical RMT, but not for SIC1. On the other hand, TMS-induced cortical MEPs at 120% RMT showed significant effect of interaction in the raw and in the normalized data. The cortical MEP amplitude was higher in 50% than in 100% handgrip strength intervention at follow-up (Figure 6A).



**Figure 6.** Cortical excitability outcomes. (A) percentage changes in cortical MEP from 120% of RMT according to baseline. Intervention simple effect showed significant differences at follow; (B) difference amplitude between post and pre cortical MEP recruitment. Intensity simple effects showed significant differences at 1.5 RMT multiple (\*\*  $p = 0.0059$ ); (C) difference amplitude between follow and pre MEP recruitment. Intensity simple effects showed significant differences at 1.5 RMT multiple (\*\*  $p = 0.0063$ ).

In the recruitment curve of cortical MEPs, RM-ANOVA showed significant effect of intensity and interaction between pre and post, and effect of interaction between pre and follow-up. Additionally, 100% of handgrip strength intervention significantly increased the cortical MEP amplitude at  $1.5 \times$  RMT with respect to 50% of MVC at post intervention and at follow-up (Figure 6B,C).

#### 4. Discussion

In a previous study we reported that eEmc combined with hand training improves hand grip force and increases spinal and corticospinal excitability in comparison to each intervention tested alone [8]. In the present study, we further investigated if the levels of both eEmc intensity and muscle strength during training could influence the results for neuromodulation at the cervical spinal cord. The results of this study show that eEmc at 90% intensity of spinal RMT of the APB muscle combined with maximal handgrip strength induced better hand function and muscle strength than the other conditions assayed. The results of F wave persistency and F/M ratio and of cortical MEP recruitment curves reflected stronger plastic changes in the spinal and cortical pathways of eEmc at 90% intensity compared to eEmc at intensities of 80% or 110%. Most of these effects were maintained at least for one hour following the intervention. On the other hand, eEmc at 110% intensity induced better hand function and higher F/M ratio and cortical plasticity changes with respect to eEmc at 80%. In contrast, eEmc at 80% of intensity did not show any noticeable effect on hand function, spinal and cortical excitability. In the second part of the study, eEmc at 90% intensity was combined with training at the maximal (100%) or at half (50%) MVC in hand grip strength. With 100% MVC, there was higher muscle strength and more plastic changes at spinal cord, measured by F wave persistency and F/M ratio, and at cortical level, measured by cortical MEP recruitment curve, than with

50% MVC. Most of these effects were also maintained at least one hour during follow-up testing. In contrast, with the 50% MVC of grip strength there was only a significant increase in cortical excitability measured by cortical MEP.

#### 4.1. Effects of eEmc Intensity

There is no consensus in the literature about which intensity of electrical stimulation may modulate more effectively the functional outputs of the cervical spinal cord. Thus, previous studies have used different methods to select the eEmc intensity. In our previous study in healthy individuals, we empirically used a stimulation intensity at 90% of spinal RMT of the APB muscle [10], whereas Benavides et al. [5] had used 100% of RMT of the Biceps brachii muscle in SCI and healthy individuals. Gad et al. [6] adjusted the eEmc to enable maximal grip strength or submaximal isometric hand movement without causing discomfort in SCI subjects. Freverty et al. [7] used varying combinations of eEmc parameters to obtain optimal facilitation of voluntary hand grip by identification of the relative activation levels of the motor pools, and combined eEmc with medication (Buspirone) without hand training. Studying cervical SCI subjects, other authors used different strategies, such as beginning eEmc at 50 mA and adjusting the intensity based on the functional task performance and subjective feedback during the intervention [9], increasing stimulus intensity in 10 mA intervals from 10 to 120 mA [8], or from 5 to 68 mA [19].

Despite the different stimulus intensity used for eEmc, the most likely direct mechanism of eEmc occurs via transcutaneous tonic spinal activation by elevating spinal networks excitability [12] and may activate interneuronal pathways that generate action potentials on motoneurons within a motor pool in a more normal stochastic time frame [13]. As such, eEmc is hypothesized to potentiate the generation of postsynaptic excitatory potentials and thus shift the spinal motor network excitability closer to the excitation threshold. The constantly changing postsynaptic potentials intrinsic to spinal networks [20] can contribute to a constantly changing population of interneurons being asynchronously activated in a random pattern [21]. According to our results, it can be interpreted that eEmc, at higher levels when delivered at 90% stimulus intensity, brings interneurons and motoneurons closer to motor threshold and, therefore, more likely to respond to descending drive, and elevates the excitability of spinal cord networks and possibly also of motor cortex. In addition, sensory afferents at the level of dorsal roots and/or the dorsal column spinal pathways may be affected by the tSCS and thus contribute differentially to elevating or suppressing spinal and/or supraspinal neural excitability [14,15,21]. Despite we cannot preclude this mechanism, considering that the stimulation was applied at C3 level, far cranial from the APB muscle root innervation segment (C8-T1), we hypothesize that the effect on muscle response is more likely due to stimulation of descending pathways and premotoneuronal network than to the stimulation of proprioceptive fibers within posterior roots.

From our results, it appears that there is a window of intensity for the neuromodulatory effects of eEmc. The effects of an eEmc intensity of 90% of spinal RMT of the target muscle exceeded the effects of lower (80%) and higher (110%) stimulus intensities. It is unclear, however, why only the 90% level of intensity enabled higher voluntarily controlled drive to produce stronger contractions of hand training, which subsequently strengthens the neuromuscular network. It is, noteworthy that eEmc at 110% intensity augmented hand muscle strength less than 90% intensity but induced more plastic changes at cortical level than 90% and 80% intensities. Perhaps the higher eEmc intensity can elicit impulses that are conducted antidromically to the cortex or induce a greater facilitatory effect among brain networks, inducing more effectively plastic changes at the cortical than the spinal level. Thus, our data suggest that eEmc at suprathreshold intensity modulates more effectively the cortical excitability than at subthreshold intensities, but hand function, muscle strength and spinal cord excitability were modulated more effectively by subthreshold intensity of 90% spinal RMT.

#### 4.2. Effects of Handgrip Strength during Training

Our results indicate that the combination of maximal (100% of MVC) handgrip strength with eEmc further increases the hand muscle strength and induces more effectively plastic changes at spinal cord and cortical levels in comparison to lower (50%) handgrip strength.

There is no consensus either about what kind of hand training could help to modulate, more effectively, spinal cord motor function in healthy individuals or following SCI. Indeed, only a few studies on eEmc at cervical cord level combined tSCS with hand training. In the study by Gad et al. [6] with cervical SCI subjects, two tasks were performed: isometric maximum handgrip contraction or voluntary rhythmic efforts of submaximal contraction (opening and closing the hand). In another study on a single SCI subject, a functional task combined with eEmc aimed to address hand grasp and pinch bilaterally [9]. In healthy individuals, we previously used maximal handgrip force for hand training combined with eEmc [10]. Several observations made after a single training or stimulation session suggest that short-term plastic changes occur [5,10,22]. Performing the maximum handgrip strength combined with eEmc at 90% of stimulus intensity modulates more effectively hand motor function and induces more effectively neurophysiological changes at spinal cord and cortical levels than when performing lower hand grip strength.

According to our results, activity-based plasticity depends on the level of hand grip strength for hand training and the eEmc intensity for neuromodulation. Activity-based neural plasticity mechanisms involve both functional modifications of existing synapses and structural changes that alter the synaptic connectivity of neurons (formation, removal and remodeling of synaptic buttons and even dendrites) [22]. A single exposure to activity-dependent plasticity by physical training combined with electrical stimulation may induce these short-term changes that in turn could promote occurrence of long-term plasticity under repeated exposure that involves mechanisms such as long-term potentiation and depression, morphological changes of dendrites, synaptogenesis and axonal branching/regeneration [23].

#### 4.3. Limitations of the Study

It has to be noted that the sample size in this study was relatively small, limiting statistical power and interpretation of the results. Four days of experiments and the long duration of each experiment may result in fatigue factors, limiting the number of replicates that could be recorded for neurophysiological parameters, resulting in more variability. The only follow-up assessment period was for one hour after the end of session, thus providing no comparison for other longer timeframes. Nevertheless, the obtained results open a work frame for further studies refining the conditions of combinatory neuromodulation for SCI patients.

### 5. Conclusions

Taken together, this study demonstrates an approach to assess two modulatory interventions, eEmc and activity-dependent intervention at the supraspinal, and spinal and peripheral levels. It also provides basic physiological responses in healthy subjects, which will help the design of future studies involving other dysfunctional conditions. The findings of the study indicate that the stimulus intensity for eEmc is relevant for improving hand function and/or muscle strength, as well as hand muscle strength level and recruitment of motor units within a motor pool during training in conjunction with electrical neuromodulation. The data also demonstrate both the immediacy and short-term persistence of at least one hour after intervention. Interestingly, our results also allow us to hypothesize that spinal and cortical excitability may be modulated differently depending on the eEmc intensity. Therefore, both the electrical stimulus intensity of eEmc and the intensity of the voluntary effort during training should be considered when optimizing rehabilitation protocols for restoring motor performance.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.K., M.R.-C., Á.F., G.G.-A. and J.V.; methodology, H.K., M.R.-C. and J.V.; software, M.R.-C.; formal analysis, H.K. and M.R.-C.; validation, H.K., M.R.-C., G.G.-A. and J.V.; investigation, H.K., M.R.-C., Á.F., L.G., I.S., G.G.-A. and J.V.; resources, H.K., M.R.-C., E.O., G.G.-A. and J.V.; data curation, H.K., M.R.-C. and L.G.; writing—original draft preparation, H.K., M.R.-C. and X.N.; writing—review and editing, H.K., M.R.-C., V.R.E., L.G., E.O., I.S., J.V., Y.G., Á.F., G.G.-A. and X.N.; visualization, H.K. and M.R.-C.; supervision, H.K. and G.G.-A.; project administration, H.K., G.G.-A. and J.V.; funding acquisition, H.K., G.G.-A. and J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by H2020-ERA-NET Neuron (AC16/00034) to G.G.-A. and J.V.; AES 2019 ISCIII (PI19/01680) to J.V.; Fundació La Marató de TV3 2017 (201713.31) to G.G.-A.; Premi Beca “Mike Lane” 2019-Castellers de la Vila de Gràcia to H.K.; and National Institutes of Health Grant 1R01 NS102920-01A1 to Y.G.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Institut Guttmann (protocol code 2017255 and date of approval: 29 April 2017).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

**Conflicts of Interest:** V.R.E. and Y.G. hold shareholder interest in NeuroRecovery Technologies and hold inventorship rights on intellectual property licensed by The Regents of the University of California to NeuroRecovery Technologies and its subsidiaries. Y.G. also holds shareholder interest in Cosyma Inc., St. Petersburg, Russia. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Gerasimenko, Y.P.; Lu, D.C.; Modaber, M.; Zdunowski, S.; Gad, P.; Sayenko, D.G.; Morikawa, E.; Haakana, P.; Ferguson, A.R.; Roy, R.R.; et al. Noninvasive Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis. *J. Neurotrauma* **2015**, *32*, 1968–1980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Megía García, A.; Serrano-Muñoz, D.; Taylor, J.; Avendaño-Coy, J.; Gómez-Soriano, J. Transcutaneous Spinal Cord Stimulation and Motor Rehabilitation in Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Neurorehabil. Neural Repair* **2020**, *34*, 3–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Calvert, J.S.; Manson, G.A.; Grahn, P.J.; Sayenko, D.G. Preferential activation of spinal sensorimotor networks via lateralized transcutaneous spinal stimulation in neurologically intact humans. *J. Neurophysiol.* **2019**, *122*, 2111–2118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gerasimenko, Y.; Gorodnichev, R.; Moshonkina, T.; Sayenko, D.; Gad, P.; Edgerton, V.R. Transcutaneous electrical spinal-cord stimulation in humans. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **2015**, *58*, 225–231. [[CrossRef](#)]
5. Benavides, F.D.; Jo, H.J.; Lundell, H.; Edgerton, V.R.; Gerasimenko, Y.; Perez, M.A. Cortical and subcortical effects of transcutaneous spinal cord stimulation in humans with tetraplegia. *J. Neurosci.* **2020**, *40*, 2633–2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gad, P.; Lee, S.; Terrafranca, N.; Zhong, H.; Turner, A.; Gerasimenko, Y.; Edgerton, V.R. Non-Invasive Activation of Cervical Spinal Networks after Severe Paralysis. *J. Neurotrauma* **2018**, *35*, 2145–2158. [[CrossRef](#)]
7. Freyvert, Y.; Yong, N.A.; Morikawa, E.; Zdunowski, S.; Sarino, M.E.; Gerasimenko, Y.; Edgerton, V.R.; Lu, D.C. Engaging cervical spinal circuitry with non-invasive spinal stimulation and buspirone to restore hand function in chronic motor complete patients. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15546. [[CrossRef](#)]
8. Inanici, F.; Samejima, S.; Gad, P.; Edgerton, V.R.; Hofstetter, C.P.; Moritz, C.T. Transcutaneous Electrical Spinal Stimulation Promotes Long-Term Recovery of Upper Extremity Function in Chronic Tetraplegia. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2018**, *26*, 1272–1278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zhang, F.; Momeni, K.; Ramanujam, A.; Ravi, M.; Carnahan, J.; Kirshblum, S.; Forrest, G.F. Cervical Spinal Cord Transcutaneous Stimulation Improves Upper Extremity and Hand Function in People with Complete Tetraplegia: A Case Study. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2020**, *28*, 3167–3174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kumru, H.; Flores, Á.; Rodríguez-Cañón, M.; Edgerton, V.R.; García, L.; Benito-Penalva, J.; Navarro, X.; Gerasimenko, Y.; García-Álías, G.; Vidal, J. Cervical Electrical Neuromodulation Effectively Enhances Hand Motor Output in Healthy Subjects by Engaging a Use-Dependent Intervention. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Guiho, T.; Baker, S.N.; Jackson, A. Epidural and transcutaneous spinal cord stimulation facilitates descending inputs to upper-limb motoneurons in monkeys. *J. Neural. Eng.* **2021**, *18*, 046011. [[CrossRef](#)]
12. Hofstoetter, U.S.; Freundl, B.; Binder, H.; Minassian, K. Common neural structures activated by epidural and transcutaneous lumbar spinal cord stimulation: Elicitation of posterior root-muscle reflexes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192013. [[CrossRef](#)]



13. Stein, R.B.; Gossen, E.R.; Jones, K.E. Neuronal variability: Noise or part of the signal? *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 389–397. [[CrossRef](#)]
14. Gomes-Osman, J.; Field-Fote, E.C. Cortical vs. afferent stimulation as an adjunct to functional task practice training: A randomized, comparative pilot study in people with cervical spinal cord injury. *Clin. Rehabil.* **2015**, *29*, 771–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gomes-Osman, J.; Tibbett, J.A.; Poe, B.P.; Field-Fote, E.C. Priming for Improved Hand Strength in Persons with Chronic Tetraplegia: A Comparison of Priming-Augmented Functional Task Practice, Priming Alone, and Conventional Exercise Training. *Front. Neurol.* **2017**, *7*, 7–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Oldfield, R.C. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* **1971**, *9*, 97–113. [[CrossRef](#)]
17. Mathiowetz, V.; Volland, G.; Kashman, N.; Weber, K. Adult Norms for the Box and Block Test of Manual Dexterity. *Am. J. Occup. Ther.* **1985**, *39*, 386–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kujirai, T.; Caramia, M.D.; Rothwell, J.C.; Day, B.L.; Thompson, P.D.; Ferbert, A.; Wroe, S.; Asselman, P.; Marsden, C.D. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J. Physiol.* **1993**, *471*, 501–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Murray, L.M.; Knikou, M. Remodeling Brain Activity by Repetitive Cervicothoracic Transspinal Stimulation after Human Spinal Cord Injury. *Front. Neurol.* **2017**, *20*, 8–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Taccola, G.; Sayenko, D.; Gad, P.; Gerasimenko, Y.; Edgerton, V.R. And yet it moves: Recovery of volitional control after spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.* **2018**, *160*, 64–81. [[CrossRef](#)]
21. Angeli, C.A.; Edgerton, V.R.; Gerasimenko, Y.P.; Harkema, S.J. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain* **2014**, *137*, 1394–1409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Smith, A.C.; Knikou, M. A Review on Locomotor Training after Spinal Cord Injury: Reorganization of Spinal Neuronal Circuits and Recovery of Motor Function. *Neural Plast.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Knikou, M. Neural control of locomotion and training-induced plasticity after spinal and cerebral lesions. *Clin. Neurophysiol.* **2010**, *121*, 1655–1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





**CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL Y  
ELECTROMIOGRÁFICA DEL MOVIMIENTO DE  
ALCANCE Y AGARRE EN ROEDORES**

---



## INTRODUCCIÓN

---

En la mayoría de las actividades diarias se utilizan las manos, ya sea para manipular objetos o para comunicarnos, lo que hace de la destreza manual una capacidad motora indispensable para una vida independiente. Una de las secuencias de actividad más recurrente de los mamíferos es el uso de su extremidad superior para alcanzar, agarrar, sujetar, manipular o trasladar un objeto, como puede suponer el hecho de alimentarse. Este complejo conjunto de acciones se ha definido como el movimiento de alcance y agarre, que en inglés se denomina Reaching and Grasping (R&G).

Este movimiento ha sido largamente estudiado en busca de su origen filogénico. Dadas las necesidades básicas que cubre, sobretodo respecto a la alimentación del individuo, se han encontrado homologías y sinergias mantenidas entre varias especies (Iwaniuk 2000). Las evidencias en similitudes biomecánicas, espaciales, temporales y estructuras neurales analizadas han demostrado la homología entre roedores y humanos del movimiento de R&G (Sacrey 2009, Whishaw 1992). Estas similitudes incluyen incluso variaciones de posición y tamaño del objeto a agarrar, así como las variaciones de estrategia para el mismo sujeto y entre sujetos.

Su conservación evolutiva a lo largo de diferentes especies ha provocado que este movimiento sea considerado un modelo de análisis de destreza manual y control motor voluntario traslacional entre especies, principalmente estudiado en roedores, primates y humanos (Klein 2012, Karl 2013, Iwaniuk 2000). Por estas razones este modelo de R&G en roedores ha sido propuesto y aceptado en la comunidad científica para estudiar el control motor manual de la extremidad superior en humanos. Se propone idóneo para estudiar las capacidades motoras y estructuras neurales responsables del movimiento, para entender mejor la pérdida y posterior posible recuperación de control motor en diferentes condiciones neurológicas como lesiones medulares, infartos o enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Klein 2012). Los resultados de la aplicación de diferentes técnicas terapéuticas tienen como fin orientar los

### ESTUDIO 3: INTRODUCCIÓN

protocolos de rehabilitación en humanos para la recuperación de la destreza manual y mejora de la vida diaria de los individuos con estas patologías.

A pesar del difícil acceso a las estructuras neurales tanto espinales como corticales, es necesario entender el control de la función motora manual para poder desarrollar nuevas terapias que promuevan la plasticidad y recuperación de la función. Mientras que la función manual ha sido ampliamente estudiada en primates no humanos (Alstermark 2012), no ha sido así en el modelo de roedores. Es necesario explorar al máximo técnicas no invasivas para su entendimiento y caracterización, como puede ser el desarrollo y estudio de modelos comportamental o de actividad electromiográfica.

La contracción muscular es la consecuencia directa de las órdenes espinales y supraespinales que controlan la función motora. El análisis de las señales de electromiografías de estas contracciones, puede aportar información sobre los patrones de reclutamiento neuromusculares y ayudar a clarificar las estructuras neurales del sistema nervioso responsables y sus afecciones neuromusculares tras una lesión.

A diferencia de la locomoción, en la que ha sido ampliamente estudiada su actividad electromiográfica, pocos estudios han analizado la actividad electromiográfica en movimiento voluntarios de la extremidad superior en roedores (Ganzer 2018, Alam 2017). En ellos, a pesar de que se cuantifican algunos aspectos fisiológicos a partir de la electromiografía, no se plantea un análisis más estructural que permita caracterizar los patrones de reclutamiento muscular.

La hipótesis de este capítulo formula que existe una red neuronal que se extiende desde los niveles supraespinales hasta la médula espinal, responsable de movimientos voluntarios y estereotipados en el reclutamiento muscular como lo es el movimiento de R&G. Una segunda hipótesis plantea la neuromodulación eléctrica como terapia para revertir la pérdida de comunicación del sistema tras una lesión medular, facilitando el movimiento mediante el aumento de la excitabilidad de las vías preservadas, previamente incapaces de dar origen al movimiento por sí solas.

El objetivo de este tercer estudio es el diseño e implementación de algoritmos matemático que permitan evaluar la actividad electromiográfica (EMG) del movimiento y traducir estos resultados en la identificación de diferentes grados de implicación del sistema nervioso. El análisis se realiza a partir de numerosas señales electromiográficas de movimientos de R&G, y se plantea con la premisa de ser una metodología que permita realizar un análisis rápido y preciso del reclutamiento de los músculos proximales y distales de la extremidad superior.

Para ello se dispone de una gran cantidad de archivos, que habían sido adquiridos con anterioridad en la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA), California (EE. UU.) por Guillermo García-Alías. Los archivos correspondían a archivos de video (\*.avi) y a un archivo con las señales electromiográficas (\*.bin).

Para este experimento, roedores hembra de raza Long Evans se entrenaron para realizar el movimiento de R&G con su pata dominante. Este movimiento lo realizaban dentro de una caja de metacrilato transparente (18x25x31cm) con una apertura a modo de ventana(3x1.5cm) seguida de una plataforma exterior donde se encontraría el pellet o bola de comestible (Karl 2011). El pellet era presentado en la plataforma y mientras, el animal se acercaba a la ventana y extendía su pata para cruzar la ventana, agarrar el pellet y trasladárselo a la boca. Se intentaba que el animal retrocediera y se moviera hacia el fondo de la caja entre los diferentes intentos, evitando así que el animal se acomodara en una misma posición hasta la presentación del siguiente pellet. Así se garantizaba la independencia de cada movimiento y voluntariedad del animal en su realización. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA) y se llevaron a cabo bajo la conformidad de las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Institutos Nacionales de Salud, Publicación No.86-23, revisada en 1985).

Todo el proceso se registraba en dos formatos. En primer lugar, una cámara de video situada en frente de la ventana registraba el comportamiento del animal, con una frecuencia de 29,97 imágenes por segundo. Y en segundo lugar, se registraba la actividad electromiográfica del movimiento por unos electrodos intramusculares (Alam 2017). Mediante cirugía, se implantaban los electrodos de cable intramusculares en los músculos de interés. Los cables se dirigían de forma



### ESTUDIO 3: INTRODUCCIÓN

subcutánea a un conector conjunto anclado al cráneo del animal, que se conectaba al sistema de registro durante el tiempo de adquisición. Los músculos en los que se implantaron los electrodos fueron el deltoides, bíceps braquial, pronador redondo, extensor digital común y flexor digital superficial de la pata dominante, y el bíceps braquial de la pata contralateral. La adquisición de la señal electromiográfica se realizaba con una ganancia de 1000 mediante un amplificador analógico multicanal (Amplificador diferencial AC modelo 1700, AM-Systems Inc., Sequim, WA, USA), y una frecuencia de muestreo de 10kHz

El estudio electromiográfico ha requerido una larga exploración de los datos disponibles para conocer las características de la señal. También ha sido necesaria la familiarización con las técnicas de procesado disponibles y el lenguaje de programación en Matlab para desarrollar los algoritmos que permitieran extraer información relevante que caracterice el movimiento de R&G.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS

#### ORGANIZACIÓN DE LOS ARCHIVOS DE VIDEO Y EMG

Todos los archivos de EMG han sido identificados, organizados y emparejado con sus homólogos videos comportamentales. En total fueron 184 registros, de 13 animales sanos y obtenidos durante seis días de experimento. Se realizaron una media de 3 registros de 5 minutos de duración por animal y día.

#### SINCRONIZACIÓN DE LOS ARCHIVOS DE VIDEO Y EMG

Los archivos de video y EMG se sincronizan al inicio de cada uno de los registros por medio de una emisión de tres pulsos simultáneos lumínicos y eléctricos, que se visualizan tanto en el vídeo como en uno de los canales del registro del archivo de EMG respectivamente. De este modo, es posible identificar una única referencia temporal para la sincronización en ambos archivos. Finalmente la sincronización temporal se realiza mediante la ecuación 1, a partir de la frecuencia de muestreo del video (29,97 Hz), y de la adquisición de datos (10 kHz), que permite transformar el número de cualquier imagen del video en instantes temporales de la electromiografía.

$$\text{Instante EMG (seg)} = \frac{n^{\circ} \text{ imagen video} - n^{\circ} \text{ imagen video pulso led}}{29,97 \left( \frac{\text{imagen}}{\text{seg}} \right)} - \text{instante EMG pulso led (seg)}$$

Ecuación 1. Fórmula matemática de sincronización de los archivos de video y electromiografía a partir de la primera imagen del pulso luminoso (video) y del instante del primer eléctrico (EMG).

### ANÁLISIS DE LOS VIDEOS COMPORTAMENTALES

#### IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN MOVIMIENTOS DE R&G

El formato de los videos comportamentales era \*.avi, y se ha utilizado el programa VirtualDub para su visualización. A partir de ellos se identifica y cuantifica el

### ESTUDIO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

número de intentos de R&G. Cada intento se define como todo aquel movimiento en el que el animal cruza la ventana para intentar alcanzar el pellet.

Para que los intentos de R&G fueran seleccionados para el análisis debían cumplir una serie de criterios: (1) Visibilidad de las patas y cuerpo del animal, durante la totalidad del movimiento; (2) La pata preferente, con la que se realizaría el movimiento de R&G, debe estar apoyada en el suelo al iniciar el intento; (3) El cuerpo del animal debe situarse perpendicular a la ventana, evitando aquellos intentos en los que el animal estuviera lateralizado respecto al plano de la ventana; (4) El animal debe recoger el pellet de la plataforma, y no de las pinzas del investigador; (5) En cada intento la pata del animal debe cruzar la ventana una única vez y no varias ocasiones repetidas sin apoyar la pata en el suelo entremedias. Una vez seleccionados los intentos se clasifican en *acierto* si el pellet ha sido cogido, transportado y liberado en la boca, o en caso contrario, *fracaso*.

#### ANÁLISIS COMPORTAMENTAL

De cada intento exitoso seleccionado se identifican los fotogramas correspondientes al inicio y al final de cada intento y de los diferentes gestos que lo componen (Karl 2011).

Los gestos marcan el inicio de las fases de R&G y debe ser anotado el número de la imagen del video en los que ocurren: *Avance*. El animal comienza el ciclo cuando levanta la pata preferente del suelo en su totalidad, sin que haya contacto con ninguna parte de la mano. Durante esta fase el animal levanta la pata, acercándola hacia el centro de la ventana, y avanza hacia el pellet cruzando la ventana. Se debe anotar el instante de seis imágenes anteriores, que asegure incluir toda actividad relativa al inicio y el posible silencio muscular previo; *Agarre*. Esta fase comienza cuando el animal posiciona la mano sobre el pellet y los dedos tocan la plataforma, justo antes de la flexión, atrapando el pellet bajo la palma de su mano. Durante esta fase el animal realiza una flexión digital para terminar agarrando el pellet; *Retirada*. Es la fase de vuelo, en la que el animal retrae el brazo para llevar el pellet a la boca. Esta fase comienza visualmente cuando el animal tiene el pellet completamente agarrado y éste se levanta de la plataforma; *Contacto con la boca*. Corresponde al instante en que el animal toca su boca con el pellet. La identificación de este momento puede verse entorpecido porque la propia mano del animal se interpone en el plano visual. Se debe anotar

la imagen en la que los dedos y los huecos interdigitales se ven paralelos a la plataforma, justo antes de que, comúnmente, baje la cabeza para manipular el pellet ayudado de la pata contralateral; *Manipulación*. Corresponde al fin del movimiento, cuando el animal libera el pellet en la boca directamente o posterior a una manipulación y, o bien vuelve a apoyar la pata en el suelo o se retira a realizar otro movimiento. Se considera fase de manipulación desde el contacto con la boca hasta el final del movimiento. En la figura 1 se muestran los fotogramas correspondientes a los distintos gesto que componen el movimiento de R&G.

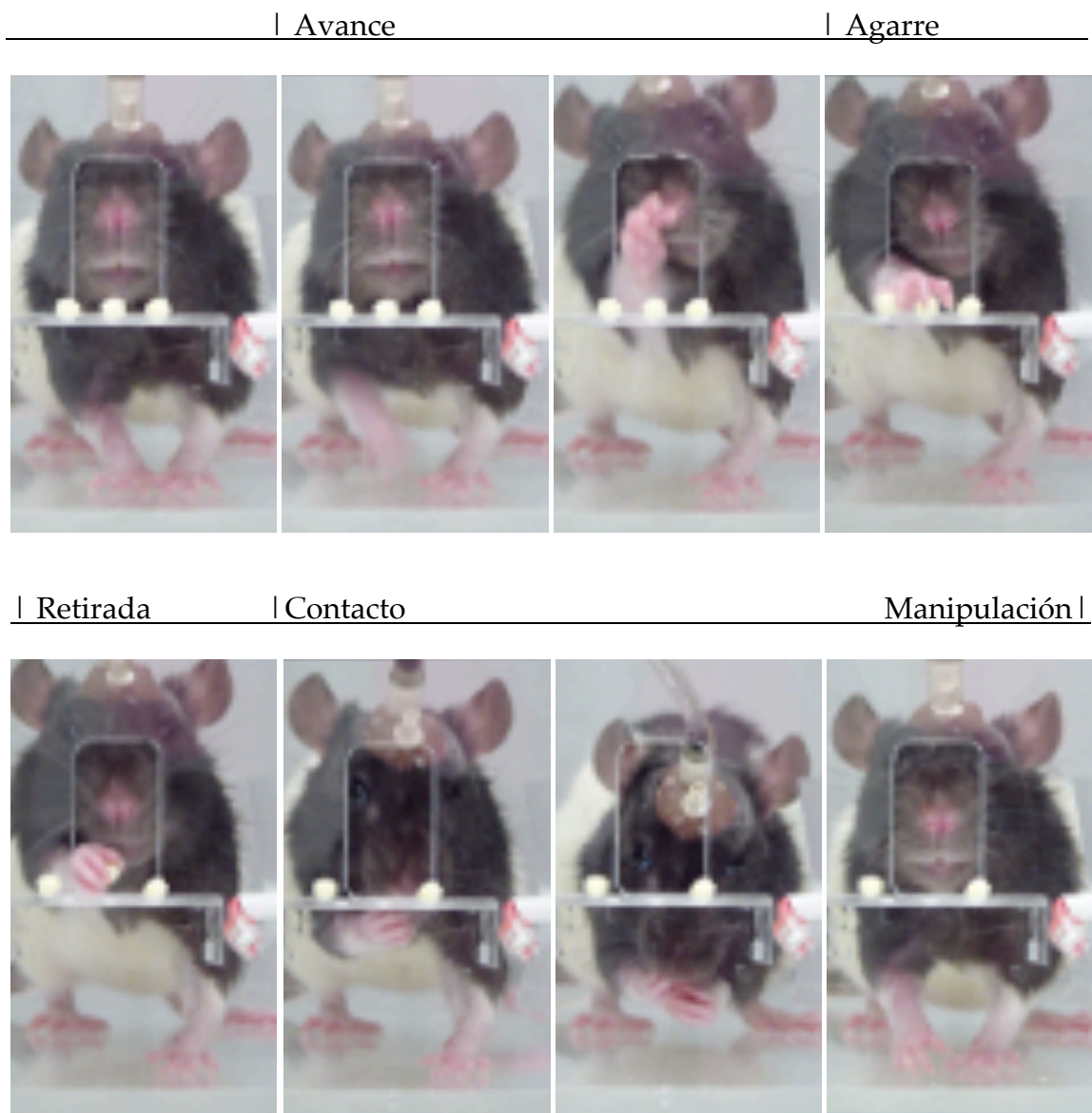


Figura 1: Secuencia de fotogramas de los gestos que marcan el inicio de las distintas fases de R&G.

## PREPROCESADO DE LOS ARCHIVOS DE ELECTROMIOGRAFÍA

### LECTURA Y REMUESTREADO

La información de los archivos de electromiografía había sido almacenada en formato binario (\*.bin) y podían ser visualizados únicamente por el programa LabView. Para su procesado, se realizó un estudio previo con programas de lectura binaria para conocer la estructura del archivo y poder ser importado a Matlab por algoritmos propios. Tras un estudio del contenido frecuencial de las señales, la frecuencia de muestreo se redujo a 4800Hz, al no presentar información de interés en frecuencias superiores.

### ELIMINACIÓN DE RUIDO

Se considera ruido toda la componente de la señal que no corresponda a la actividad muscular. La fuente de ruido es desconocida y puede depender de muchas variables (Micera 2010). Es necesario encontrar un protocolo de filtrado que aisle y filtre al máximo estas componentes que perturban las señales y contaminan la actividad muscular. Se probaron diferentes técnicas:

- *Wavelet denoising*. A partir de una onda, seleccionada por el usuario de un banco de ondas de Matlab, el algoritmo se diseña para variar en escala la onda y recorrer la señal intentando localizar ondas similares. Estas ondas deben ser semejantes a los potenciales de acción musculares, y se suaviza o elimina aquellas que no lo sean.

- *Aplicación de filtro tipo Notch*. Es un tipo de filtro rechaza-banda, que permiten pasar todo el contenido frecuencial excepto el indicado en una banda concreta.

El ruido presente en las señales es estable y único en cada señal, y varía entre músculos del mismo registro y entre registros. Por esta razón, se decidió buscar un filtro óptimo para la cancelación de ruido, que se ajuste a cada registro.

- *Filtro Wiener*. Este filtro óptimo utiliza una señal de entrada como referencia del ruido a cancelar en cada señal muscular de cada registro. Para evitar tomar actividad muscular como referencia de ruido, se diseña un algoritmo que recorre la señal mediante ventanas seleccionando aquella que menos actividad acumule, que previsiblemente corresponda a un silencio muscular. La señal comprendida

entra ventana, será la señal de referencia de ruido basal sin actividad muscular que tomará la función *WienerNoiseReduction* de Matlab para filtrar cada una de las señales (Pascal Scalart 2021).

#### EXTRACCIÓN Y SEGMENTACIÓN DE LOS MOVIMIENTOS

Tras el remuestreado y el filtrado para reducir la contaminación del ruido de la señal, se procede a extraer los segmentos de los registros electromiográficos que corresponden a los intentos de R&G seleccionados.

Se utilizan los instantes anotados previos al avance, y el del fin del movimiento. Se localizan las posiciones en la que se encuentran estos instantes en el vector de tiempo electromiográfico y se extrae y guarda la señal entre ambas marcas en todos los canales simultáneamente. Se crea una matriz de movimientos individuales junto con los instantes de los eventos comportamentales.

### ANÁLISIS DE LAS SEÑALES DE ELECTROMIOGRÁFICA

#### SELECCIÓN DE MOVIMIENTOS

Se diseña un algoritmo que permite, mediante preguntas al usuario, buscar y agrupar en una nueva matriz un subgrupo de los movimiento según las respuestas recibidas. Las respuestas se comparan con a la información asociada a cada movimiento (animal, fecha, número de registro, acierto, error o tipo de error) y genera booleanos (0 o 1) por cada pregunta. Se seleccionando aquellos que más coincidencias presenten. De esta forma se agruparon todos los movimientos que habían sido exitosos y el animal había comido el pellet.

#### PREPROCESADO DE LA SEÑAL

Se requiere un preprocesado de la señal para facilitar una representación de la actividad muscular de manera más compacta. En primer lugar se realiza un rectificado de la señal para positivizar todos los valores de la señal. A continuación, se evalúan distintos tipos de análisis para el cálculo óptimo:

- *Envolvente de picos*. Esta función recorre la señal analizando ventanas de N muestras, en las cuales se realiza una interpolación entre los picos de mayor amplitud relacionados con los potenciales de acción, resultando en una

### ESTUDIO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

envolvente de grandes amplitudes, menos ajustado cuanto mayor sea el tamaño de la ventana (N). Se utilizó la función *envelope* de Matlab.

- *Envolvente de root mean square (rms)*. Los valores de cada ventana se elevan al cuadrado, se promedian y se calcula la raíz cuadrada, resultando en una envolvente de amplitud promedio. Cuanto mayor sea el tamaño de la ventana, mayor efecto de suavizado al influir menos los valores de los grandes potenciales de acción. Se realizó también una combinación de envolventes *peak* y *rms* para aunar sus efectos.

- *Suavizado de envolventes*. A partir de las señales normalizadas al máximo de la señal, se realiza una media móvil para suavizar las mínimas variaciones en la superficie de la envolvente. El suavizado se realizó con la función *movmean* de Matlab. Posteriormente se aplicaba un filtro de ajuste polinómico como es el filtro Savitzky-Golay, para un mayor suavizado. Algunos resultados pueden verse en un trabajo previo (Rodríguez-Cañón 2018).

- *Uso del operador de energía de Teager-Kaiser (TKEO)* (Solnik 2010). Permite obtener una representación de la señal basada en la proporcionalidad de la amplitud instantánea y la frecuencia de la misma (Kaiser 1990, 1993), destacando las propiedades de la señal y reduciendo el ruido. El procesado de la señal se basa en una ponderación de los valores instantáneos valorando también el anterior ( $n-1$ ) y el posterior ( $n+1$ ) como muestra la ecuación 2. Seguidamente se aplica un filtro pasa bajos de orden 4 y frecuencia de corte 12Hz para reducir las grandes fluctuaciones de algunos picos, reduciendo y aglutinando los cambios bruscos de actividad para la mejora de la relación señal-ruido.

$$\text{TKEO}[x(n)] = x^2(n) - x(n+1)x(n-1)$$

Ecuación 2. Fórmula matemática del método TKEO. X, corresponde a la señal y n, al instante temporal o muestra.

### DETECCIÓN DE INICIO Y FINAL DEL CICLO.

Se estudian diferentes métodos para la detección del inicio de actividad de los músculos así como el final del ciclo (sin manipulación) y poder automatizar simultáneamente su identificación en todos los movimientos seleccionados. La selección del método se realiza a partir de la inspección visual y detección manual

de los instantes de inicio y fin del ciclo realizada por un investigador experto, utilizando los siguiente métodos:

- *Factor multiplicativo de la desviación estándar de la actividad basal de la señal EMG* (Lee 2007). El inicio de actividad se calcula como el instante en el que la actividad muscular supera a la media de la actividad basal más 2 veces el valor de la desviación estándar.

- *Porcentaje de la amplitud máxima*. El inicio de actividad corresponde al instante en el que la actividad supera un porcentaje, de 5 a 25, del valor del pico máximo de cada señal. Algunos resultados de estos dos métodos pueden verse en un trabajo previo (Rodríguez-Cañón 2017).

- *Ratios entre máximos locales*. A partir de los máximos locales del TKEO, se calculan los ratios entre ellos. Cuanto mayor es el ratio, mayor es la diferencia de amplitud entre los picos evaluados. El inicio de actividad corresponde al mínimo local que se encuentre entre los dos picos que mayor ratio presenten, ya se interpreta como el cambio de silencio muscular a una fuerte actividad. El fin de actividad se define como el valor en el que la actividad muscular vuelve a ser inferior que el inicio detectado (Castillo-Escario 2019).

- *Derivada matemática de la señal preprocesada*. Mediante esta técnica se detectan los cambios de pendiente de la actividad muscular. La señal utilizada es la preprocesada obtenida a partir de la previa aplicación del TKEO y su filtrado a 12Hz. Para el inicio de actividad, la búsqueda del cambio de pendiente de la actividad se acota entre dos instantes temporales de las marcas comportamentales: entre el inicio del movimiento y la posición media entre *avance* y *agarre* para deltoides, bíceps y pronador; entre el inicio del ciclo, determinado por uno de los tres músculos anteriores, y el *agarre* para extensor; entre el inicio de actividad del extensor y la *retirada* para el flexor; entre el inicio y fin del movimiento para el bíceps contralateral. La señal derivada se normaliza al valor máximo de esta ventana. Se selecciona el primer máximo local que supere el 10% de este valor máximo dentro de esta ventana, asegurando no detectar pequeños cambios de actividad por potenciales de acción aislados, y detectar actividad productiva para el desarrollo del movimiento. Si no es posible detectar este valor, se toma la posición del valor máximo de la derivada normalizada. Se



### ESTUDIO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

segmenta la derivada desde el inicio del movimiento hasta este valor seleccionado, se normaliza a la unidad y se busca la posición en la que comienza el cambio (valor 0). En el caso que no fuera posible su localización matemática, el inicio se estima como la posición media entre los dos instantes que determinan la ventana de búsqueda de este cambio de actividad para cada músculo, excepto para el bíceps contralateral, que será el instante del contacto con la boca. El algoritmo notifica de que músculo y señal ha tenido que adjudicar un inicio de actividad no detectado por cambio de actividad, para así podreecer a su inspección y validación.

El fin del ciclo se ha definido como el momento en el que animal toca su boca con la mano para proceder a la liberación del pellet, que puede ser directa o después de un proceso de manipulación con una o ambas patas. Se determina como ventana de análisis entre el inicio de la fase de retirada y la posición media entre el inicio de la fase de liberación y el final del movimiento. Se realiza en este caso un suavizado media móvil a la señal preprocesad previo a este análisis para reducir el número de máximos locales de la señal al reducir las fluctuaciones de la señal. La derivada de la señal se normaliza al mínimo detectado en esa ventana, y se busca el punto en el que este valor se reduzca un 80% en dirección hacia el final del ciclo, es decir, en el 20% previo a llegar a 0. En este caso sí se aplica este umbral genérico y no se busca alcanzar el valor 0, ya que debido a la aplicación de la media móvil se suaviza la señal. Esto provoca que los cambios de actividad se alarguen en el tiempo y la señal retrase en exceso su llegada a cero identificando un final de ciclo más tardío que el real.

#### NORMALIZACIÓN TEMPORAL

Para que las señales sean comparables, se necesita transformar todas las señales a una misma longitud temporal. Para ello se determina una nueva longitud de la señal, según el número de muestras deseadas en el nuevo vector, y se le otorgan los valores de 0 a 100 para representar la evolución del ciclo desde el inicio y final del mismo detectado previamente. Esta normalización y su nueva frecuencia también afecta a la fase de manipulación, que presentará los valores superiores a 100. Por último se interpolan los valores de la señal con el vector temporal original al nuevo vector normalizado al 100% del ciclo.

## CARACTERIZACIÓN ELECTROMIOGRÁFICA DEL R&G

### ANÁLISIS TEMPORAL

#### *DURACIÓN DEL CICLO*

A partir de la detección de inicio y el fin del ciclo y del movimiento se calcula la duración real del ciclo y del movimiento respectivamente. Se toman las posiciones de estos instantes en el vector de tiempo de cada movimiento y la diferencia de sus valores corresponderá a la duración absoluta. Se realiza para cada movimiento a nivel individual y posteriormente se agrupan por animal. A partir de los instantes de los gestos comportamentales localizados en el vector de tiempo de las señales de electromiografía, se calcula también la duración de las fases que tienen lugar entre estos gestos principales.

#### *LATENCIAS MUSCULARES*

Para determinar la secuencia de activación de los músculos dentro del movimiento se calculan las latencias musculares, que corresponden al tiempo que tarda un músculo en activarse respecto al inicio del movimiento, que en este caso corresponde al primer músculo en activarse. Los resultados se presentarán en tiempo absoluto (segundos) y tiempo normalizado (porcentaje del ciclo). Esta segunda representación en porcentaje permite la comparación entre animales y tener una referencia poblacional.

#### *CENTRO DE GRAVEDAD*

Se define como el instante en el que el músculo alcanza el 50 % de su actividad acumulada. A partir de la señal preprocesada, se calcula en todos los músculos la amplitud acumulada desde el inicio del ciclo hasta el final del ciclo y hasta el final del movimiento, incluyendo la manipulación. Se toma el valor máximo, que corresponde al último de la actividad acumulada, y se normaliza siendo este último valor el 100%. Posteriormente se identifica en el vector la posición en la que se alcanza el 50% de la actividad acumulada, definiendo el centro de gravedad. Se realiza para cada movimiento individual y a nivel poblacional, tanto en tiempo absoluto como en tiempo normalizado.

Se presentan conjuntamente los centros de gravedad del ciclo y del movimiento, de forma que se pueda comparar la presencia o no de diferencias entre ellos. El desplazamiento hacia posiciones más tardías reflejará una mayor acumulación de

### ESTUDIO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

actividad por una presencia mayor de actividad durante la manipulación de el músculo en consideración. En caso contrario, que no suponga un desplazamiento del centro de gravedad durante la manipulación, el músculo no habrá sido requerido y por tanto reclutado para llevar a acabo la manipulación del pellet.

#### *DISTRIBUCIÓN DEL RECLUTAMIENTO MUSCULAR*

Se calcula la diferencia de ambos centros de gravedad respecto a su latencia individual para así analizar si ha tenido una actividad puntual, una actividad continúa o se desplaza hacia el principio o final del ciclo y/o del movimiento.

### ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD MUSCULAR

#### *ENERGÍA MUSCULAR*

Se calcula la curva de energía del movimiento como la actividad que acumula en toda la duración. Se utilizan las señales procesadas mediante TKEO. Una vez calculada la curva de energía se presenta la media de cada animal, normalizada al ciclo y a la máxima energía alcanzada, que corresponde con el último instante del movimiento. Muestra la evolución de las contribuciones musculares de cada musculo a lo largo del ciclo y de la manipulación. Aquellos músculos que no contribuyan a la manipulación se acercarán y se estabilizarán en su máximo al alcanzar el final del ciclo. Permite un mejor entendimiento de la distribución de los centros de gravedad.

#### *MATRIZ DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN*

Mediante la correlación cruzada entre señales, es posible obtener un coeficiente (rango de 0 a 1) que representa la correlación o similitud entre dos señales temporales. La señales son normalizas en tiempo y en amplitud, al valor máximo de amplitud de todo el movimiento, no solamente del ciclo. De esta manera todas las señales estarán en el mismo rango, distribuyéndose aquí todas las amplitudes que produce su reclutamiento. A partir de las señales normalizadas se calculan los coeficientes de correlación cruzada de cada ciclo con el resto. Se realiza a nivel individual de cada señal, y con las señales medias de cada animal. En el caso de la auto correlación, el coeficiente será máximo (1).

Se presentan las señales procesadas medias de cada animal, normalizadas en amplitud y tiempo, del ciclo completo. A continuación, se presentan las matrices de los coeficientes de correlación entre todos los ciclos individuales para cada

músculo, seguidos de los ciclos medios de cada animal. Adicionalmente, se calcula el coeficiente medio de correlación de cada músculo a nivel de población.

#### *MATRIZ DE COACTIVACIÓN MUSCULAR*

El reclutamiento temporal de los músculos implicados puede ser puntual o mantenido en el tiempo y pueden tener relaciones de coactivación durante el movimiento si coinciden sus activaciones en el tiempo, o bien presentar una relación de músculo agonista (activo) y antagonista (inactivo).

Se toma la señal procesada del movimiento, ciclo y manipulación, y se normaliza en amplitud al máximo de la señal y en tiempo al 100% del ciclo. Se comparan las señales de cada músculo con el resto de los músculos del mismo ciclo y de la manipulación por separado. La representación de cada punto queda reflejada en las matrices de coactivación resultantes, que representará el número de puntos coincidentes en esos valores de amplitud normalizada.

Para cuantificar la densidad de puntos de la matriz resultante y las relaciones de coactivación o no de los músculos se calcula el porcentaje de puntos respecto al total que almacena cada uno de los 16 cuadrantes en los que se divide la matriz (4 divisiones por cada eje). De esta forma se cubre la relación de amplitud de los músculos en cuatro umbrales crecientes del 25% del máximo.



## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE VIDEO Y PROCESADO ELECTROMIOGRÁFICO

#### CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS

Se identifican un total de 184 registros de 13 animales, de los cuales deben existir sus correspondientes archivos de EMG y video comportamental. Durante este proceso de verificación de los 184 pares de archivos, 49 de ellos se descartan por falta de archivo de video comportamental y 8 por imposibilidad de lectura del archivo de EMG al estar dañados. Adicionalmente, se descartan 10 videos más por ausencia del pulso luminoso e imposibilidad de realizar la sincronización. Estos inconvenientes reducen la muestra total a 117 pares de archivos válidos para el análisis.

#### ANÁLISIS DE LOS VIDEOS COMPORTAMENTALES

En la primera inspección de los videos, que cuantifica el número de intentos en R&G que los animales realizaban, se identifican cinco videos en los que el animal #02 no realiza ningún movimiento de R&G (Tabla 1).

Tabla 1. Datos absolutos y en porcentaje del número de videos totales, intentos de R&G identificados y seleccionados, y aciertos y errores. \* Seleccionados respecto a los identificados. \*\* Aciertos y errores respecto a los seleccionados.

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	Total (n°)	Total (%)
Videos	13	5	8	22	7	18	24	22	20	14	17	5	9	184	-
Identif.	69	0	27	241	68	109	299	520	224	263	317	50	91	2278	100
Selecc.	12	0	2	56	21	22	47	80	68	33	71	26	20	458	20,1*
Aciertos	10	0	1	39	17	11	29	34	37	17	53	25	16	289	63,1**
Errores	2	0	1	17	4	11	18	46	31	16	18	1	4	169	36,9**

El número de videos con información relativa al R&G se reducen de 117 a 112 pares de archivos de 12 animales. De los videos de estos 12 animales se identifican 2278 intentos, de los cuales se seleccionan según los criterios previamente explicados (Ver *Identificación y selección de movimiento de R&G*) un total de 458. La

### ESTUDIO 3: RESULTADOS

tabla 1 presenta las proporciones de seleccionados, y la posterior distribución de estos en aciertos y errores, a nivel individual de cada animal y total.

Los videos de todos los intentos con acierto seleccionados posteriormente se analizan para describir la secuencia de gestos comportamentales que componen el movimiento de R&G. El estudio detallado de los fotogramas permite identificar y anotar el instante temporal en el que los animales realizan el avance de la pata, agarre del pellet, retracción de la pata, posicionamiento del pellet en los labios y finalmente su manipulación y liberación en la boca. La figura 2 muestra los fotogramas de los distintos gestos durante la ejecución de un R&G con acierto y la subyacente sincronizada actividad muscular de los músculos de la pata, a través de las señales de EMG.

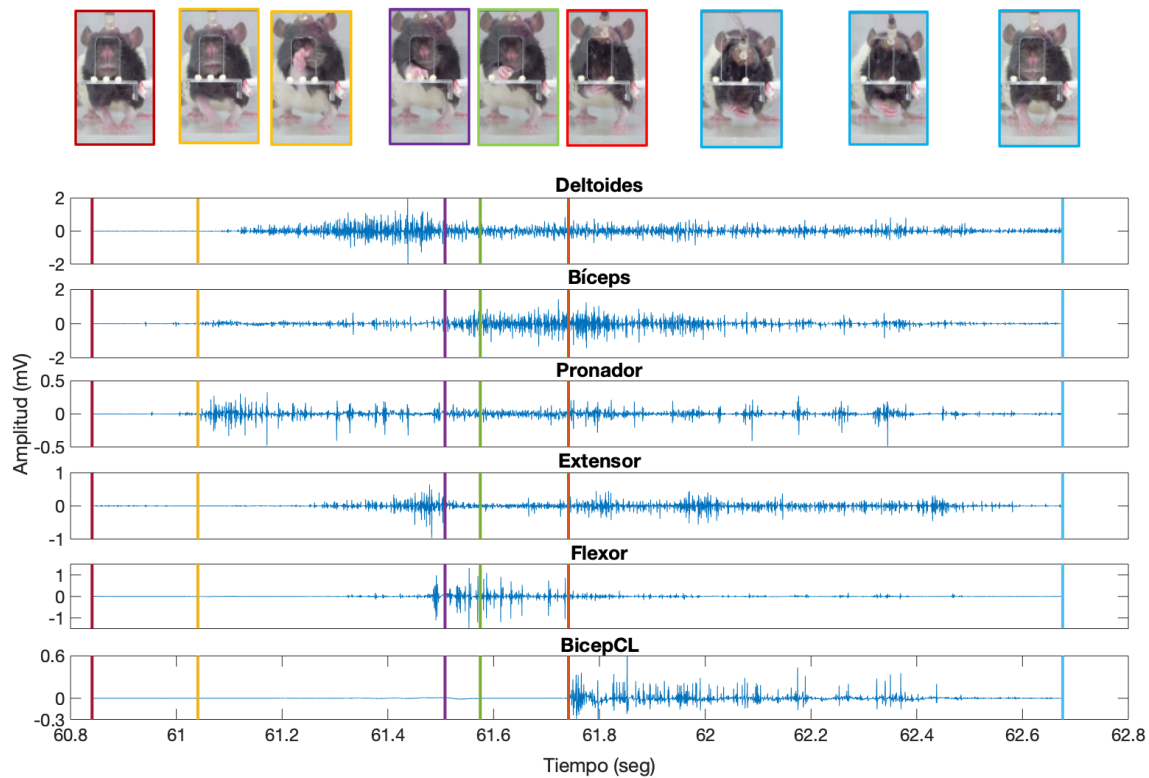


Figura 2: Relación de los gestos y la electromiografía. Por colores: granate: previo inicio del ciclo; amarillo: avance, morado, agarre; verde, retirada; rojo, contacto con la boca; azul, manipulación. Corresponde al *Animal #09-102412-4-2*.

## PREPROCESADO ELECTROMIOGRÁFICO (REGISTROS)

### LECTURA Y REMUESTREADO

Tras la exploración de los archivos binarios, se determina que presentaban un formato binario *big-endian*, que marca la dirección de lectura para acceder a los bytes y decimal (*float*) de 32 bits o 2 bytes de tamaño (16 bits por byte).

El estudio de frecuencia realizado a varios registros justifica la elección de 4800Hz como la nueva frecuencia de muestreo al no presentar contenido frecuencial de interés a partir de 2400Hz (frecuencia de Nyquist) (Figura 3B)

### ELIMINACIÓN DE RUIDO

Tras probar diferentes formas de ondas, la técnica del *Wavelet denoising* se descarta por que eliminaba mucha información potencialmente de interés al confundir ruido con la actividad muscular. El filtro *Notch* podía eliminar la contribución de la línea eléctrica americana (60Hz) y sus múltiplos u armónicos. Todas las señales no presentaban el mismo contenido frecuencial en estas frecuencias, lo que provocaba que la respuesta del filtro debiera ser ajustada a cada señal para evitar eliminar contenido frecuencial de la actividad muscular. Por esto la eliminación del ruido por parte del filtro *Notch* resultaba insuficiente al presentar una contaminación de la señal en el resto de las frecuencias y se descarta.

En cambio, el filtro Wiener se ajusta a las necesidades de eliminación de ruido de cada señal, identificando en qué frecuencia y con qué magnitud se presenta en un tramo de inactividad muscular, evitando así eliminar contenido frecuencial del reclutamiento muscular. En la figura 3 se muestra la eliminación del ruido de diferente naturaleza en el dominio temporal (señal electromiográfica) y en el dominio frecuencial (espectrograma y espectro de amplitud).

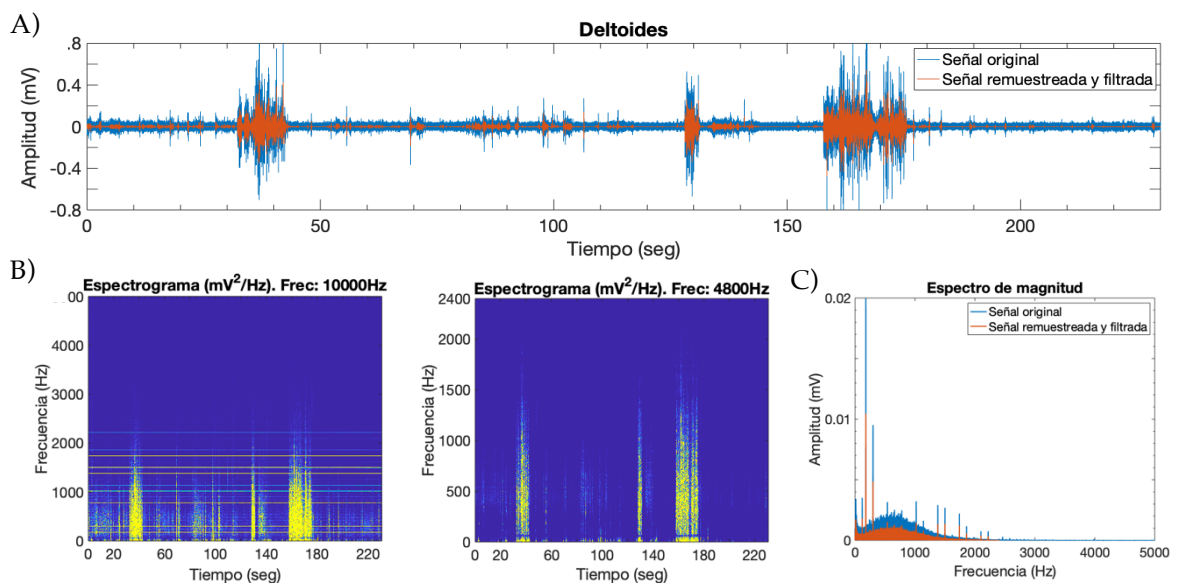


Figura 3. A) Superposición de la señal electromiográfica muscular original (10kHz) y remuestreada (4800Hz) y filtrada (Wiener). B) Espectrogramas de la señal original (izquierda) y remuestreada y filtrada (medio). C) Espectro de magnitud de la señal original y remuestreada y filtrada. Corresponde al Animal #06-102612-1-Deltoides



### ESTUDIO 3: RESULTADOS

Las señales del animal #04, se descartan por una contaminación excesiva de la señal probablemente por fallos en las conexión que saturaban la señal de entrada.

## PREPROCESADO ELECTROMIOGRÁFICO (MOVIMIENTOS)

### PREPROCESADO

La función envolvente de *peaks* y *rms* permite obtener dos versiones preprocesadas de la señal electromiográfica, priorizando la primera una representación de las grandes amplitudes, y la segunda resaltando la densidad de los potenciales de acción y su amplitud. La raíz cuadrada de los valores menores a 1, resultan en un valor superior al original y viceversa. De esta manera los potenciales de acción de amplitudes bajas y medias, con mayor densidad que los altos, elevan su presencia, resultando en una envolvente de amplitud promedio. El tamaño de la ventana de muestras influye, resultando en una señal de mayor suavizado cuanto mayor sea la ventana en ambos casos como puede verse en la figura 4A. La señal resultante de su combinación es suavizada mediante una función de media móvil. Esta técnica fue descartada porque se necesita ajustar los tamaños de ventana a cada señal por las necesidades de reclutamiento de cada animal, según la actividad muscular tenga mayor o menor densidad, sea continua en el tiempo o pulsátil, pudiendo suavizar en exceso la señal. Las ventanas móviles además tienen un efecto de retardo en la formación de la nueva señal que pueden comprometer la posterior identificación de inicio y fin de actividad.

La aplicación del filtro Savitzky-Golay produce un fuerte suavizado, que ajusta la señal a la actividad muscular más destacable, convirtiendo en nula aquella actividad de menor intensidad relevante para el ciclo y la detección de sus inicios.

El TKEO ha sido la técnica seleccionada para el preprocesado de las señales. Su resultado es una versión alisada y compacta de la actividad muscular, basada en los valores de amplitud y la frecuencia de los potenciales. De esta manera integra en equilibrio la amplitud y densidad de los potenciales de acción de la señal. La amplitud se reduce respecto a la señal por la propia fórmula matemática, que reduce parcialmente los valores elevados de amplitud, dando protagonismo a los bajos y medios. A pesar de ello, el valor de la mediana de amplitud es muy similar, un 0.0680 mV de la señal original frente a un 0.0542 mV de la señal de TKEO filtrada a 12Hz, mostrando una adecuada proporcionalidad en amplitud.

En la figura 4B y 4C se observa el resultado de TKEO y su impacto en el suavizado, de acuerdo con la frecuencia de corte del filtro pasa bajos.

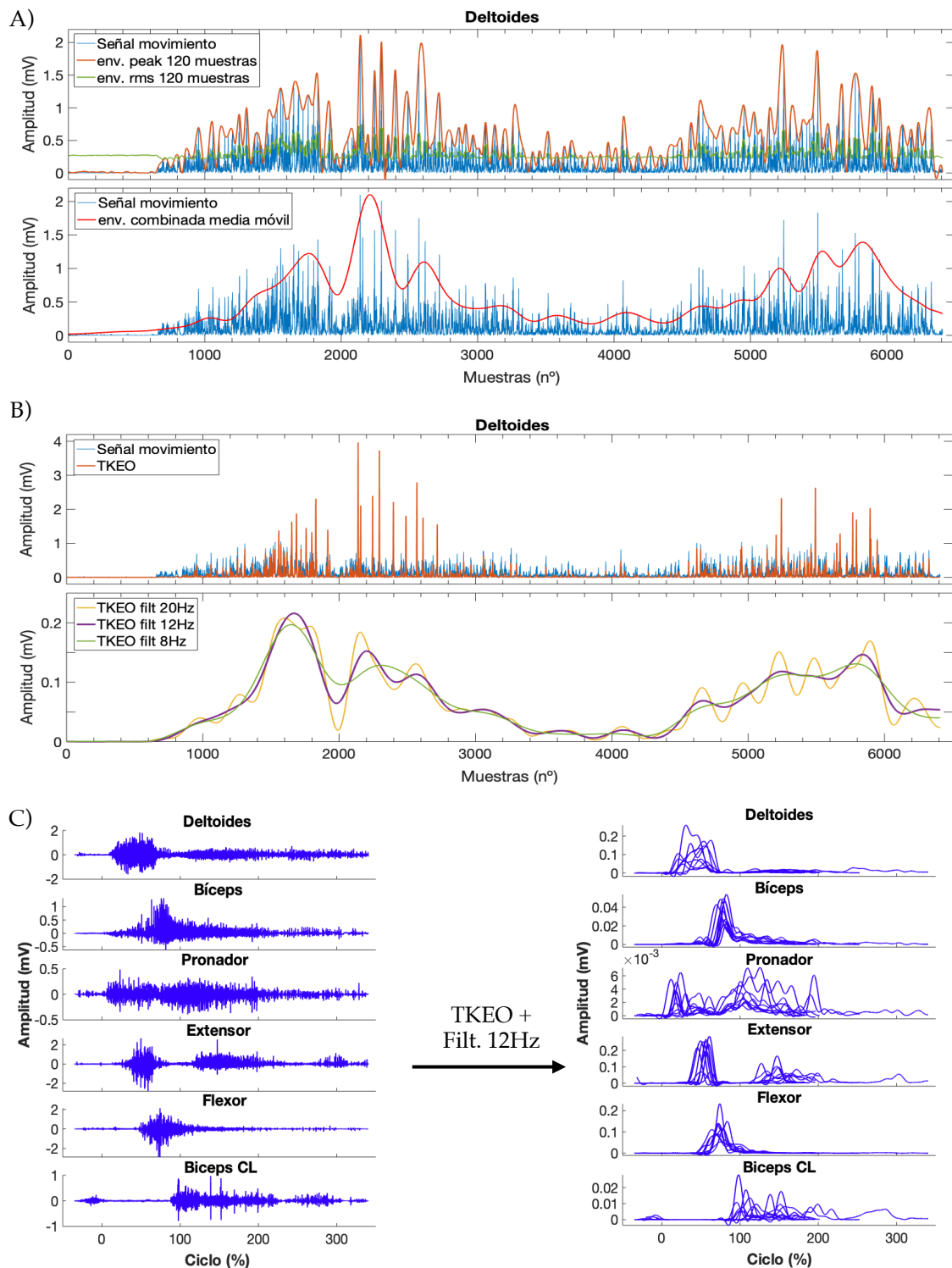


Figura 4. Preprocesado de la señal. A) Superposición de la señal y su envolvente mediante la función *envelope peak* y *rms* (superior) y su combinación tras la aplicación de la media móvil (inferior). B) Superposición de la señal y su TKEO (superior). Señal TKEO filtrada a 20, 12 y 8 Hz. *Animal #13-102412-5.2-Deltoides*. C) Superposición de las señales originales de los movimientos del animal normalizadas al 100% del ciclo, y tras la aplicación del TKEO y su filtrado a 12Hz. Corresponde al *Animal #11*

#### DETECCIÓN INICIO Y FIN DE ACTIVIDAD.

Se evalúan distintos procedimientos para identificar estos instantes temporales de forma automática. Las técnicas del factor multiplicativo de la desviación estándar de la actividad basal o el porcentaje del valor máximo de la amplitud de la señal fueron descartados por la necesidad de variar los umbrales según las necesidades de la señal y la inestabilidad en algunos casos de actividad basal que comprometía los resultados (Rodríguez-Cañón 2017). La técnica de máximos locales de TKEO es susceptible al umbral de suavizado del TKEO, ya que cuanto menor suavizado, mayor cantidad de ratios susceptibles de ser inicios de actividad, lo que complica la detección automática. La detección automática del fin del ciclo no tenía presente la continuidad de actividad durante la manipulación, que comprometía los resultados (Castillo-Escario 2019). Al hacer pruebas en una población mayor y con más variabilidad no resulta ser una metodología adecuada.

Finalmente se selecciona la derivada de la señal preprocesada, como procedimiento idóneo para la detección de forma satisfactoria. El reclutamiento muscular comienza con un cambio de actividad desde el silencio muscular a los primeros potenciales de acción de la unidad motora (PUAM). Estos cambios pueden ser detectados mediante la derivada de la señal, que expresa el nivel de cambio en sus valores. Sus máximos corresponden al punto de máximo cambio ascendente, mientras que los mínimos corresponden al máximo cambio de actividad descendente. Los máximos y mínimos locales, así como los silencios de actividad de la señal original se traducen a valores nulos o cercanos a cero ya que su variación se ralentiza.

La figura 5 muestra el resultado de esta detección. En la parte superior se muestra la señal preprocesada y en la parte inferior su derivada normalizada al máximo de la señal en la ventana indicada para el análisis (entre línea roja y negra discontinua), y sus máximos locales resaltados. El primer máximo detectado no supera el 10% del máximo (0.1) y por tanto no es seleccionado. Por lo tanto el inicio de activación es el instante en el que el segundo pico y máximo de esta ventana, alcanza el valor 0 en sentido descendente hacia el inicio de la señal. La figura 5, muestra el cálculo del final del ciclo a partir de la señal del músculo flexor. En la parte superior se muestra la señal simplificada y su media móvil. La justificación de la aplicación de la media móvil es reducir el número de

fluctuaciones de la señal simplificada y evitar tener varios mínimos locales en la derivada que pueden aportar un fin de actividad erróneo. En la parte de la columna de la izquierda de la figura 5 puede observarse la bajada de actividad del bíceps alrededor del inicio de la liberación, como en el flexor, aunque con numerosas fluctuaciones debido a su consiguiente participación durante la manipulación, lo que dificulta la determinación del mínimo que identifique el fin de actividad. El flexor también presenta actividad posterior, aunque en menor medida, lo que justifica su elección para determinar el fin del ciclo. Una vez se identifica el mínimo en esta ventana de análisis, se recorre la señal hacia el final del movimiento, hasta reducir su amplitud un 80% (-0.2). En la columna de la derecha se comprueba cómo la aplicación de la media móvil retrasa la llegada de la derivada a 0 y compromete al algoritmo a determinar un final de ciclo erróneo.

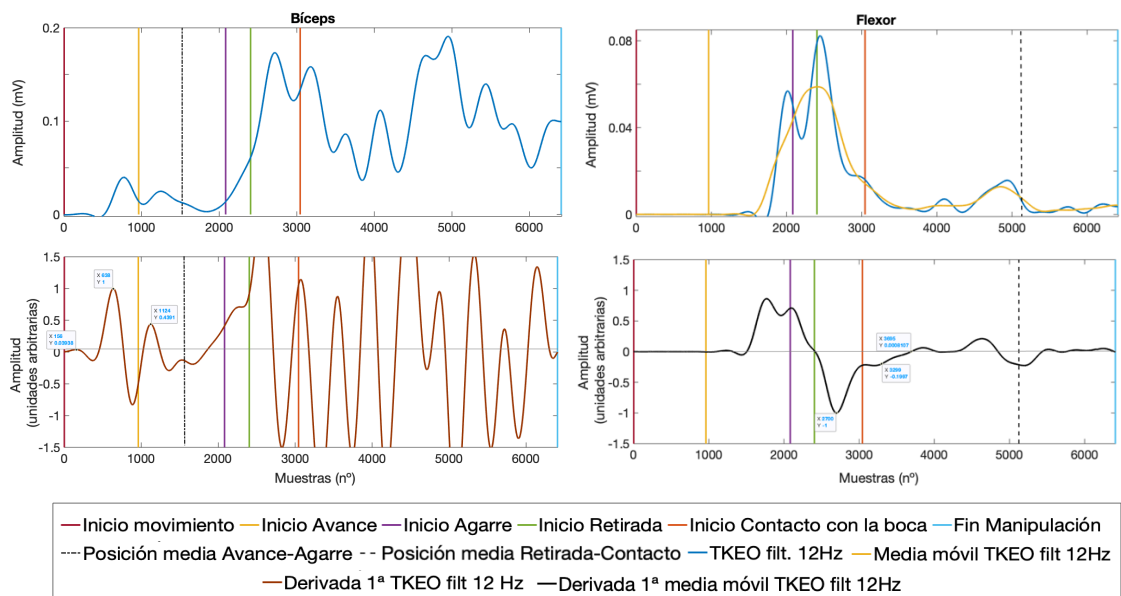


Figura 5: Ejemplo de detección del inicio de actividad (izquierda) y fin de ciclo (derecha) mediante la derivada de la señal preprocesada. En la fila superior se presentan las señales procesadas con el TKEO y filtro de 12Hz, y en el caso del fin de actividad, también su media móvil. En la fila inferior, se encuentran las derivadas primeras de estas señales preprocesadas, y normalizadas al máximo de la ventana determinada de búsqueda. Aparecen cursores con los valores de la señal donde se aprecian valores importantes para la descripción del procedimiento. *Animal #13-102412-5.2- Biceps/Deltoides*

Tras el análisis comportamental y electromiográfico se crea una base de datos con la que caracterizar el movimiento. Para que las estrategias individuales tuvieran el mismo grado de aportación al modelo, se seleccionan 10 movimientos (el mínimo que presenta el animal #01) aleatoriamente de los 10 animales que no presentan ningún problema. El animal #02 fue descartado por falta de movimientos, animal #03 por no cumplir el mínimo de 10 aciertos, y el animal #05 por señales con problemas de registro. Finalmente la base de datos para la categorización está formada por 100 movimientos, 10 por cada animal.

## CARACTERIZACIÓN DEL MOVIMIENTO DE R&G

El preprocesado de las señales electromiográficas mediante la técnica del TKEO seguido de un filtrado pasa bajos a 12 Hz permite tener una representación mejorada de las señales en cuanto al patrón de reclutamiento muscular. Es un equilibrio entre la densidad de potenciales de acción y su amplitud. Incluye toda la información relevante para el movimiento y evita al algoritmo caer en posibles errores por potenciales de acción aislados. Se utiliza como señal de entrada para realizar el análisis electromiográfico, que junto al análisis comportamental, permite hacer una categorización del movimiento del R&G a nivel poblacional que se presenta en esta sección.

Las señales individuales resultantes de este preprocesado pueden ser revisadas en la figura 6, agrupadas por animal. Se han normalizado a un nuevo vector de tiempo en porcentaje basado en la duración del ciclo. Las duraciones de las señales se presentan variables debido a las diferentes duraciones de las manipulaciones. Las señales están alineadas al inicio del ciclo, en 0%. Las variabilidades de amplitud necesitan ser normalizadas para poder realizar una comparación adecuada entre movimientos del mismo animal y entre diferentes animales, categorizando así el reclutamiento a nivel poblacional.

Esta representación permite observar las variabilidades internas entre movimientos de un mismo animal, así como cada una de las estrategias de reclutamiento muscular que cada uno tiene durante el ciclo de R&G y la manipulación. Estas estrategias varían según se presente la activación de cada uno de los músculos, que incluyen por ejemplo la presencia de estas activaciones durante el ciclo, la manipulación o ambas; o si son puntuales o continuas y mantenidas en el tiempo. A pesar de estas diferencias entre animales, esta figura deja entrever un patrón de reclutamiento altamente similar durante el ciclo en secuencia y patrón de activación. En esta sección se presentarán los resultados asociados a este análisis para la categorización del movimiento de R&G en animales sanos.

### ESTUDIO 3: RESULTADOS

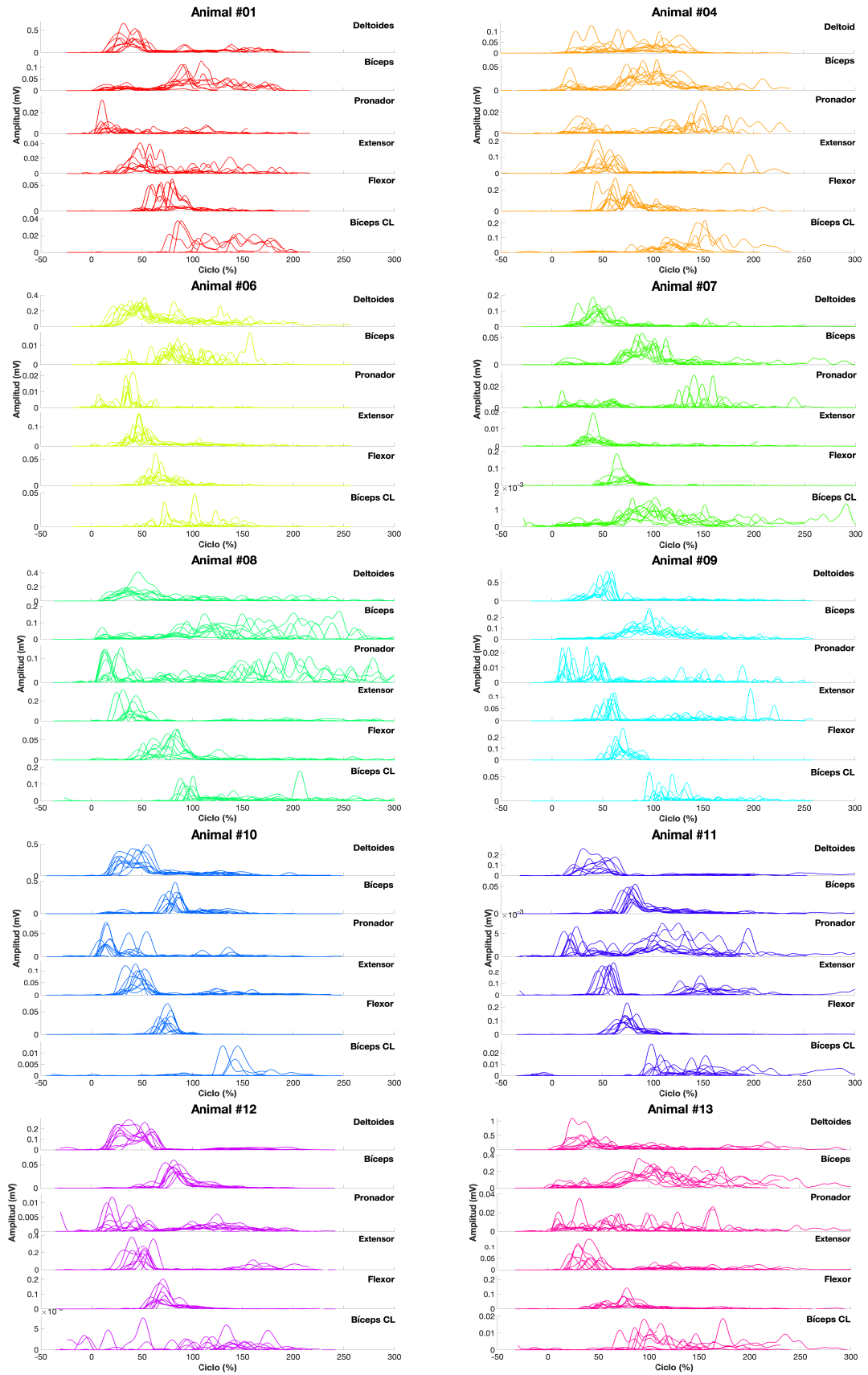


Figura 6: Señales TKEO filtradas a 12Hz que representan una versión preprocesada de las señales originales de todos los movimientos de cada animal. Normalizadas al ciclo en porcentaje y alineadas al inicio de cada ciclo. La amplitud no está normalizada y es la original resultante del TKEO filtrado.

### ESTUDIO 3: RESULTADOS

Una de estas señales durante el movimiento de R&G, cuya amplitud ha sido normalizada al máximo que alcanza en cada uno de los músculos, se presenta en la figura 7. Su amplitud ha sido distribuida en un gradiente de colores, que permite interpretar cómo y cuando se activan los músculos y la distribución de su intensidad del reclutamiento según se realiza el movimiento (ciclo y manipulación). Permite ya fácilmente observar como el reclutamiento muscular sigue una activación secuencial y que puede fluctuar en el tiempo, sobretodo durante la manipulación por las necesidades específicas de este tramo.

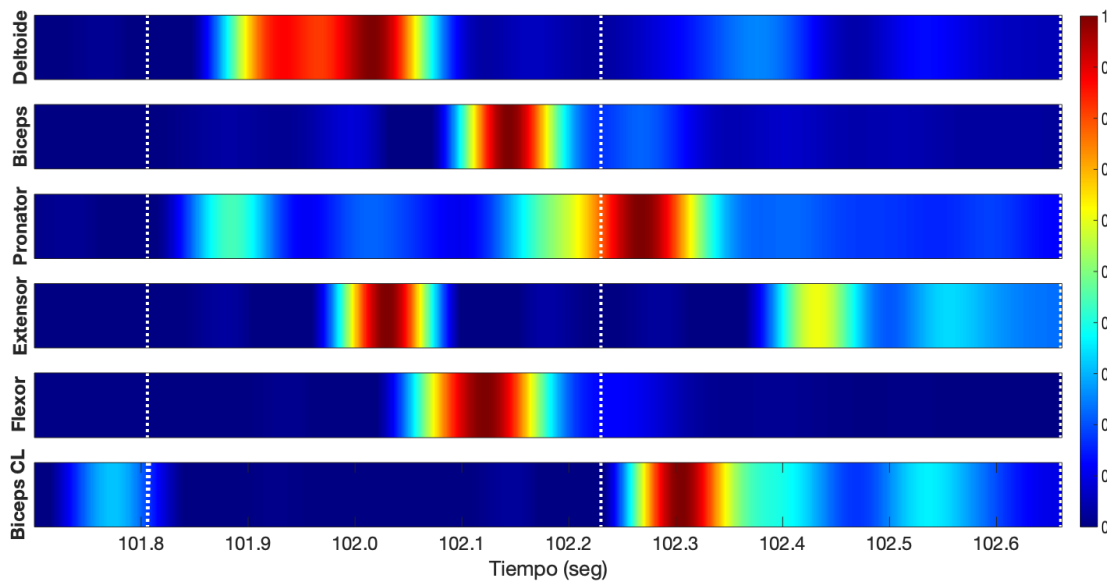


Figura 7: Representación electromiográfica de un movimiento de R&G en el tiempo a lo largo de varios músculos. Amplitud normalizada al máximo de cada señal. Las líneas verticales blancas representan por orden de izquierda a derecha, el inicio del ciclo y movimiento, fin del ciclo, y fin del movimiento. El gradiente de colores representa la amplitud de la señal, en un rango de 0 a 1. Corresponde a *Animal #11-12212-1.4*

### ANÁLISIS TEMPORAL

#### *DURACIÓN Y LATENCIAS MUSCULARES*

El previo análisis comportamental permite identificar los gestos que inician las fases de R&G y guiar así la segmentación de los movimientos y el análisis electromiográfico. Gracias a la sincronización del video y el EMG, estos instantes se localizan en el dominio temporal de la EMG y se ha calculado su duración (Figura 8A). Las duraciones de las fases comprendidas entre los gestos comportamentales se corresponden con las observaciones del análisis de video. La fase de avance hacia el agarre presenta una duración media superior a los 0.2 segundos, mientras que la fase de agarre apenas alcanza los 0.1 segundos de duración y la fase de retirada es inferior a 0.2 segundos. Es destacable la gran variabilidad de la fase de liberación y/o manipulación del pellet. Estos valores

representan todas las liberaciones de pellet, desde las tempranas en algunos casos hasta las más comúnmente tardías por la manipulación de este, con una o ambas patas, hasta finalmente liberarlo completamente en la boca. La duración media de esta fase de encuentra alrededor de 0.6 segundos.

Con la detección del inicio y fin del ciclo a través de la detección de cambios de actividad detectados por las derivadas, es posible calcular la duración del ciclo y del movimiento completo, ciclo más la manipulación. La duración media del ciclo es superior a los 0.6 segundos, mientras que el movimiento completo (ciclo más manipulación) ronda una duración media de 1.2 segundos (Figura 8 B). En la figura 8C se presentan esta duración de ciclo y ciclo mas manipulación en media de cada animal. Hay casos, como el animal #08, cuya duración media del ciclo más la manipulación casi triplica la del ciclo.

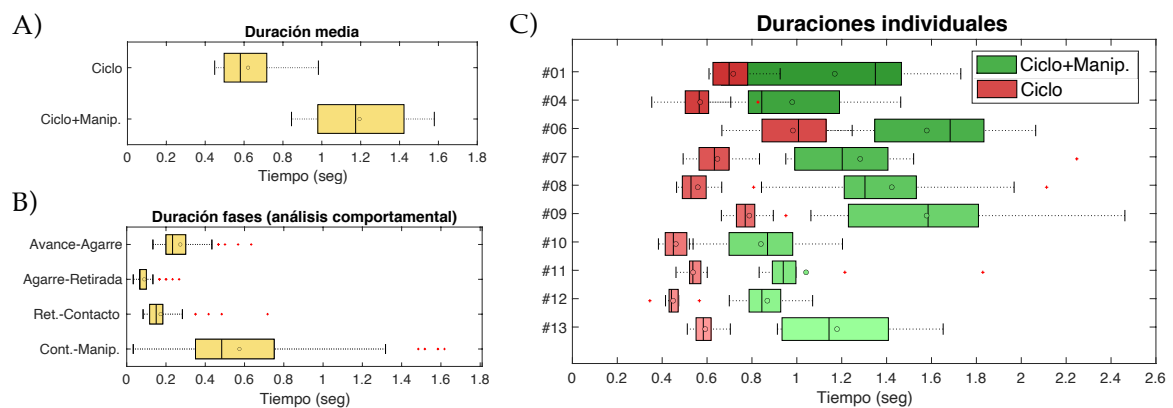


Figura 8: Duraciones del movimiento de R&G. A) duración de las fases entre los gestos identificados durante el análisis comportamental de los videos. B) duración del ciclo y del movimiento completo de R&G del total de movimientos seleccionados. C) Duración del ciclo (rojo) y movimiento completo (verde) de R&G a nivel individual por cada animal. o: media; |: mediana; caja de color: valores entre los percentiles 25 y 75; llaves laterales: valores más extremos excluyendo los valores atípicos; +: valores atípicos.

El inicio del movimiento se define como el instante en el que se activa el primer músculo, a partir del cual se calculan las latencias musculares del resto de músculos. En la figura 9 se muestran las latencias musculares medidas a nivel medio de cada animal y posteriormente a nivel poblacional en tiempo absoluto en segundos y porcentual del ciclo. Se observa una clara secuenciación temporal en la activación muscular en la que el pronador se activa primero, seguido del bíceps, deltoides, extensor, flexor y por último el bíceps contralateral. Por tanto este análisis fija el pronador como el primer músculo en activarse e iniciar el movimiento.



## ESTUDIO 3: RESULTADOS

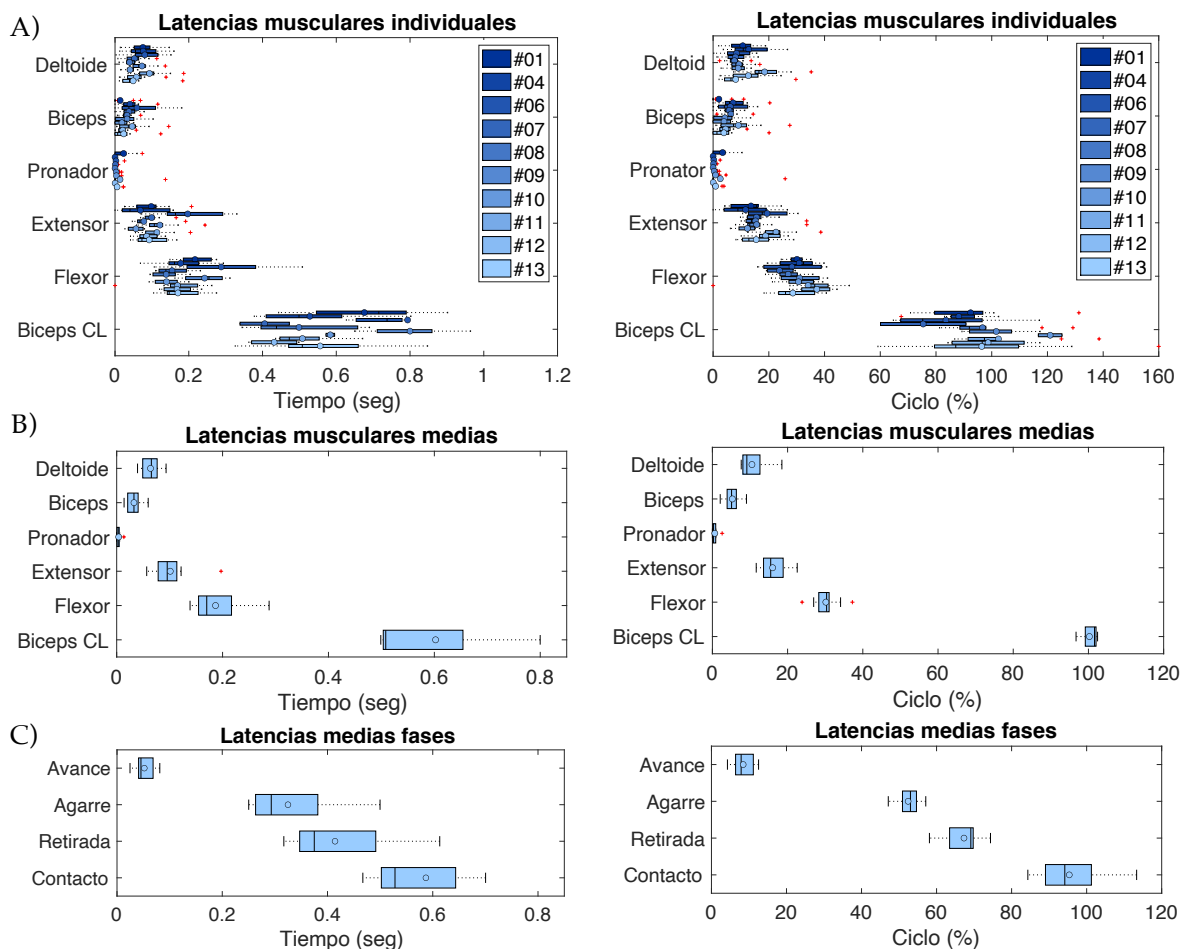


Figura 9. Latencias musculares. A) Latencias musculares individuales de cada animal en segundos y en porcentaje del ciclo. B) Latencias musculares medias de todos los animales, en segundos y porcentaje del ciclo. C) Latencias del comienzo de las fases del R&G marcadas por los gestos detectados en el análisis comportamental, en segundos y porcentaje del ciclo. o: media; l: mediana; caja de color: valores entre los percentiles 25 y 75; llaves laterales: valores más extremos excluyendo los valores atípicos; +: valores atípicos.

Se localizan también las latencias de los gestos comportamentales detectados en el análisis de video, a partir del inicio electromiográfico del movimiento (Figura 9C). Este análisis sitúa el gesto de avance posterior al inicio de actividad de pronador y bíceps, mientras que entre el avance y el agarre se activan el deltoides, extensor y flexor. La activación del bíceps contralateral coincide con la latencia de la fase de liberación y manipulación, y con el final del ciclo.

### CENTRO DE GRAVEDAD

El centro de gravedad permite cuantificar como se distribuye la actividad dentro de un margen de tiempo. En la figura 10 se presentan los centros de gravedad individuales y medios de todos los músculos durante el ciclo y durante el ciclo más la manipulación.

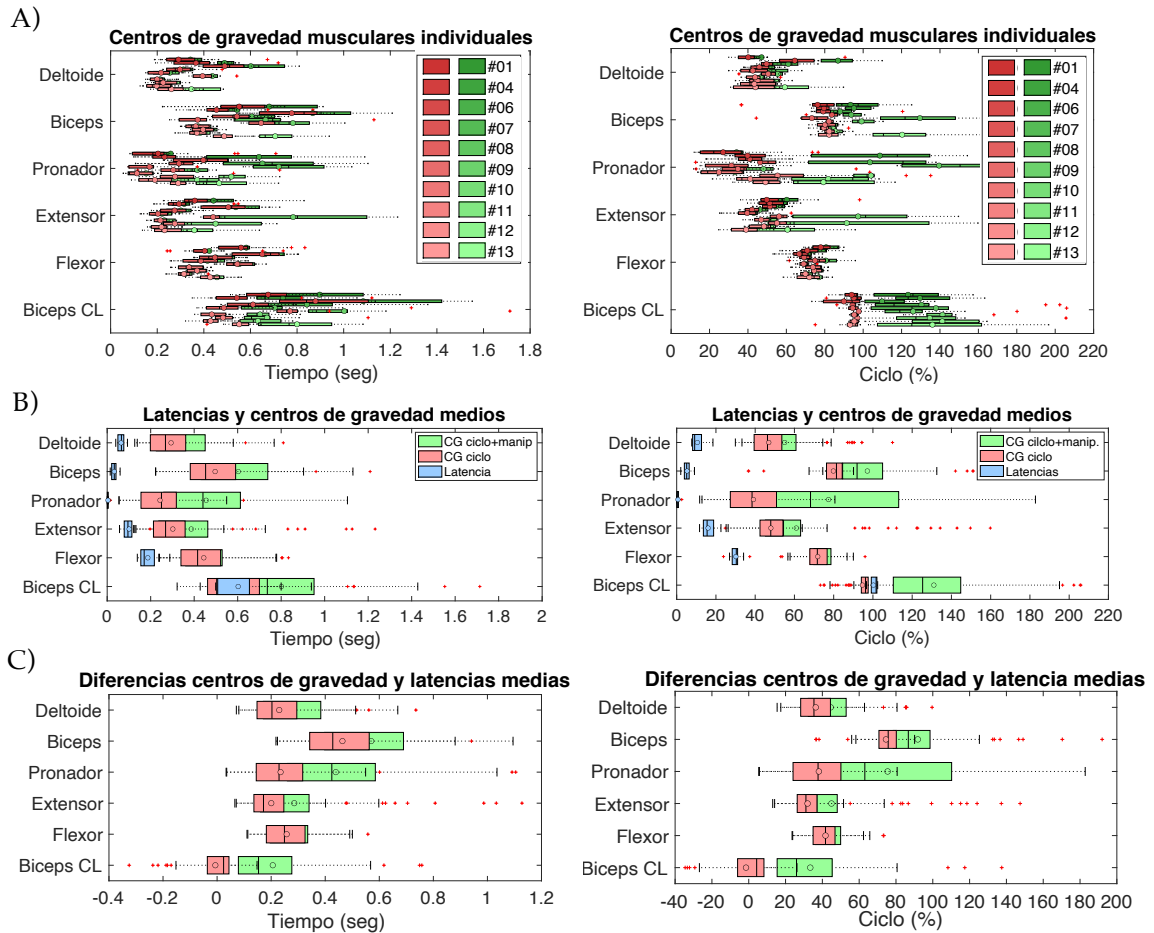


Figura 10: Centros de gravedad musculares desde del ciclo y del movimiento. A) Centros de gravedad musculares individuales en segundos y porcentaje del ciclo. B) latencias y centros de gravedad musculares medios en segundos y porcentaje del ciclo. C) Diferencias de los centros de gravedad respecto a sus latencias.

En el caso del deltoides y del flexor apenas varían su centro de gravedad del movimiento completo respecto al del ciclo. En cambio, esto no ocurre en el resto de los músculos (bíceps, pronador, extensor y bíceps contra lateral) que presentan un mayor retardo en el centro de gravedad del ciclo más manipulación. Los retardos del centro de gravedad del ciclo más la manipulación respecto al del ciclo son de entre 0.1 y 0.2 segundos de media.

En la figura 10B, se presentan los centros de gravedad junto con las latencias medias, y en la figura 10C las diferencias entre ellos, que permiten cuantificar así el patrón de reclutamiento de cada uno de los músculos. Durante el ciclo el deltoides, pronador, extensor y flexor presentan un retardo del centro de gravedad respecto a la latencia de aproximadamente 0.2 segundos, entre el 30 y 40 % del ciclo desde su latencia (Figura 10C). Destaca el bíceps que alcanza su centro de gravedad más de 0,4 segundos después de activarse inicialmente, un

### ESTUDIO 3: RESULTADOS

80% más tarde. El centro de gravedad del ciclo del bíceps contralateral se alcanza alrededor de su latencia e inicio de actividad, que coincide mayoritariamente con el fin del ciclo.

### ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD MUSCULAR

#### ENERGÍA MUSCULAR

Las medias de las curvas de energía de la señal, preprocesada por animal durante el ciclo, se presentan en la figura 11. Se han normalizado al máximo de energía alcanzada en todo el movimiento, incluyendo la manipulación. De esta manera es posible interpretar la distribución del reclutamiento muscular a lo largo del movimiento y su posible contribución a la fase de manipulación, según que valor alcancen durante el ciclo.

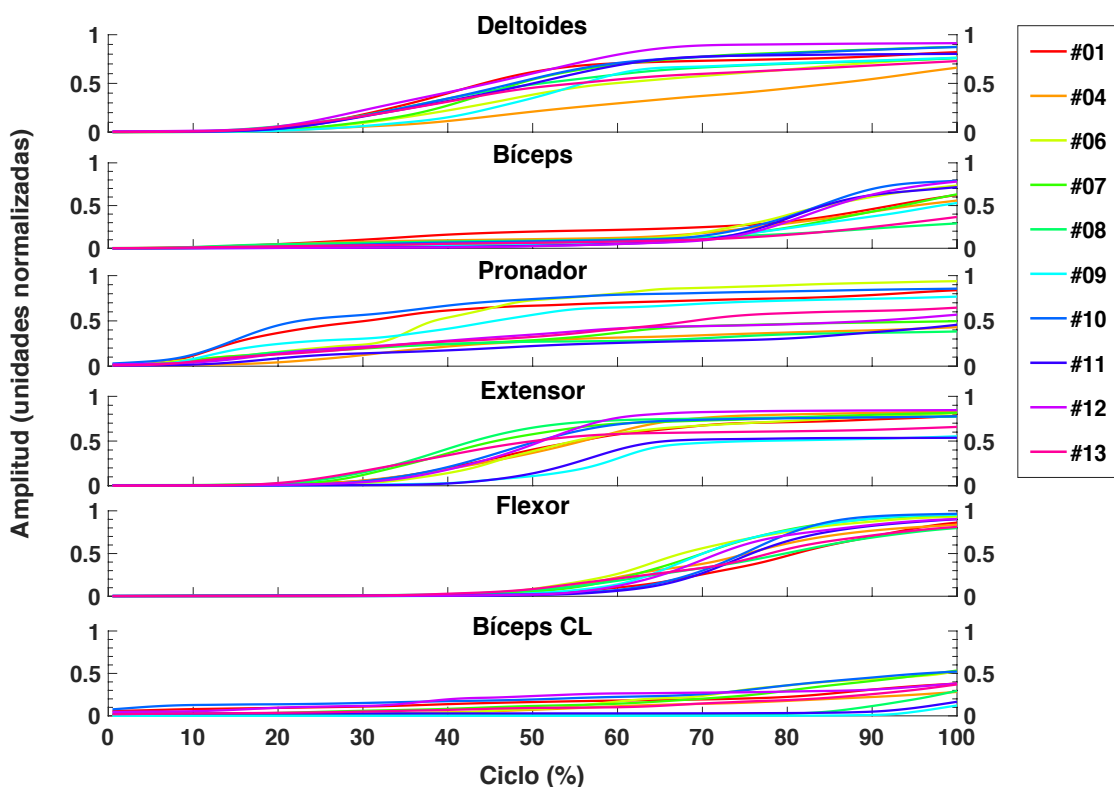


Figura 11: Curvas de energía muscular durante el ciclo de las señales simplificadas mediante TKEO y filtrado a 12Hz. Esta curvas han sido normalizadas en amplitud a su máximo de energía alcanzado durante todo el movimiento, y en tiempo al 100% del ciclo.

Cuando la curva de energía se estabiliza y/o alcanza valores máximos antes de finalizar el ciclo, se informa de su mínima o nula participación y contribución en el desarrollo de la manipulación (deltoides y flexor). Otra opción de estabilización

es la que ocurre con el extensor, que se muestra estable al final del ciclo aunque entre el 50 y 90% de su máximo, lo que da a entender su contribución a la liberación y/o manipulación del pellet tras contactar con la boca, en mayor o menor medida según el animal. Ambos bíceps y pronador no presentan estabilización de la energía acumulada, lo que significa que siguen sumando energía tras el contacto del pellet en la boca. Por lo tanto su participación se presenta como indispensable para el desarrollo la fase de manipulación.

#### *MATRIZ DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN*

A continuación se presentan los coeficientes de correlación entre cada uno de los ciclos individuales con el resto de los ciclos en la segunda columna de la figura 12. Para una mejor apreciación se presentan al lado los coeficientes de correlación de las señales preprocesadas medias, y el porcentaje de correlación medio de la población para cada músculo.

La media de las señales individuales preprocesadas de cada animal se presenta en la primera columna de la misma figura. Se normalizan en porcentaje al 100% del ciclo y al máximo de amplitud de cada músculo y señal (del movimiento completo, no sólo el ciclo).

El animal #04 presenta menor correlación en el deltoides, comparado con el resto de los animales, cuya curva de reclutamiento presenta una mayor activación en la parte final del ciclo que en el principio, como sucede con el resto. El valor mínimo de correlación es de 0.66. El bíceps presenta valores muy similares y altos de correlación, siendo el mínimo valor 0.72. En el caso del pronador, su reclutamiento es más fluctuante y variado entre los diferentes animales, lo que sitúa a muchos de los valores de coeficientes de correlación alrededor del 0.7. El extensor presenta unos niveles de correlación altos, excepto entre los animales que presentan una actividad del extensor más retrasada en el ciclo como son el #09 y #11, respecto a los más tempranos como son el #07, #08 y #13. En estos casos concretos los valores de coeficiente de correlación rondan el 0.5. El flexor presenta unos niveles de correlación superiores a 0.82 en todos los casos. Dada la naturaleza del bíceps contralateral, y su baja actividad durante el ciclo hace las fluctuaciones basales provoquen discrepancia entre las señales y los valores de correlación sean medio bajos.

### ESTUDIO 3: RESULTADOS

Destacan los altos valores de similitud medios por cada uno de los músculos, por encima del 0.71, que demuestran que el movimiento de R&G es muy semejante entre animales.

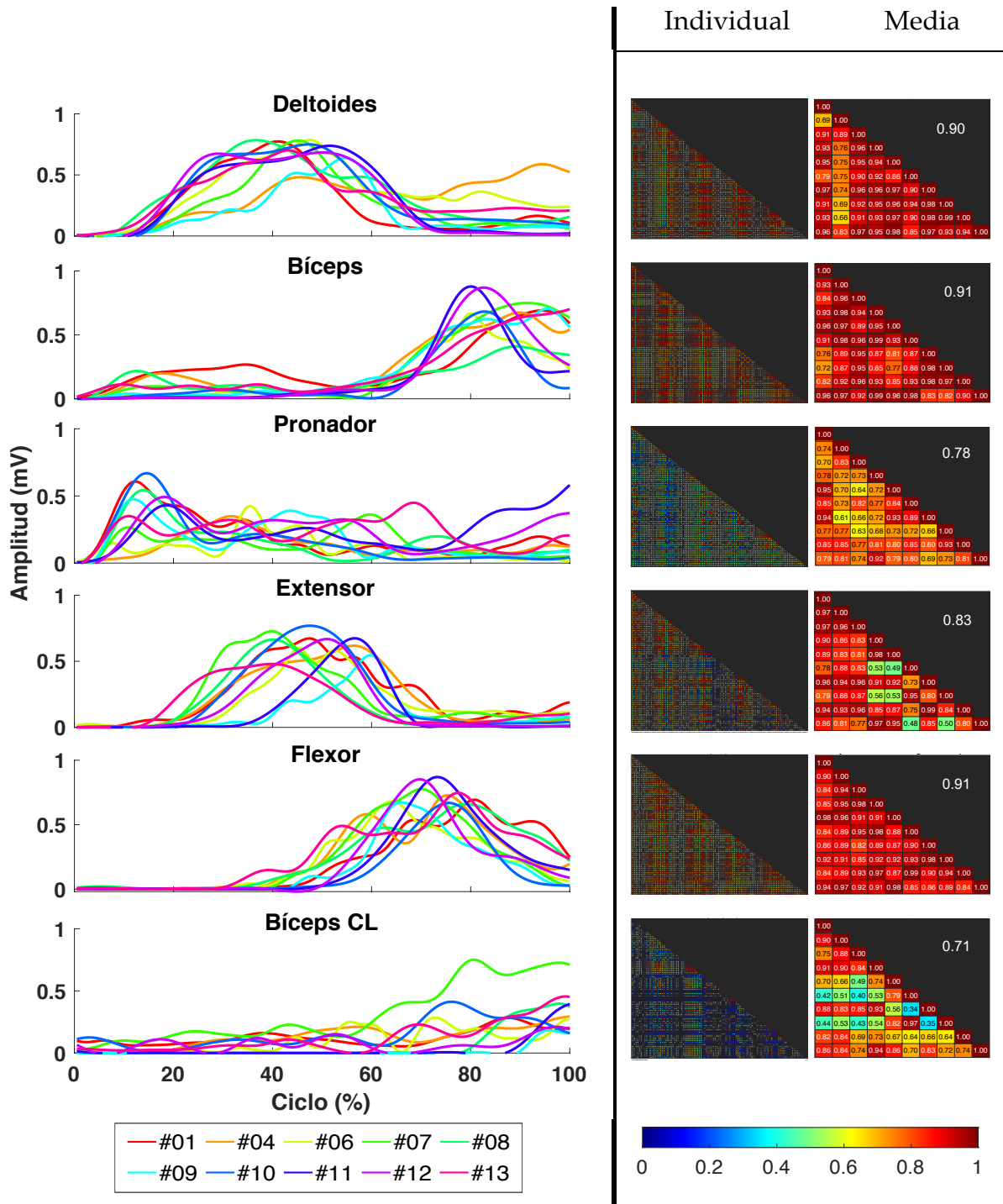


Figura 12. Coeficientes de correlación del ciclo de R&G. (Izquierda) Señales TKEO filtradas a 12 Hz, medias de cada animal. Normalizadas al porcentaje del ciclo y a la amplitud máxima de todo el movimiento. (Derecha) Coeficientes de similitud de las señales a nivel individual de cada ciclo (primera columna) y en media de cada animal (segunda columna) por orden de arriba abajo en el eje vertical y de izquierda a derecha en el eje horizontal. Ambas comparaciones tienen un gradiente de color de 0 a 1 que corresponde con el nivel de similitud. En el caso de las comparaciones entre animales también se han añadido los valores de estos coeficientes medios de la población por músculo (en blanco).

*MATRIZ DE COACTIVACIÓN MUSCULAR*

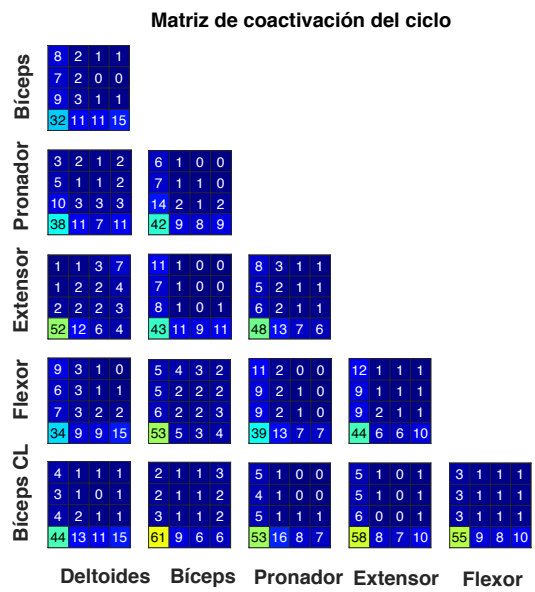
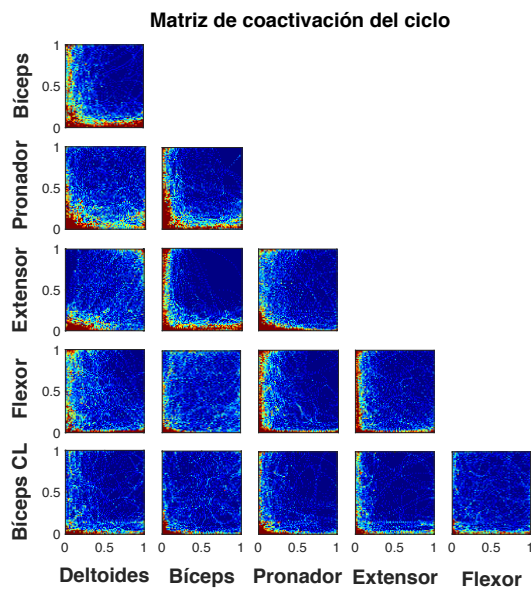
En figura 13 se representan los nubes de puntos y el porcentaje de densidad que alberga cada cuadrante. Durante el ciclo, existen relaciones de alto grado de antagonismo entre extensor y bíceps y extensor flexor, ya que el rango de amplitud de cada uno presenta valores mínimos del otro, concentrándose la densidad de puntos en los ejes. En cambio el extensor y el deltoides presentan una coactivación tanto a niveles bajos de amplitud como a niveles altos, coincidiendo sus valores máximos. El bíceps y el flexor se coactivan, aunque no en sus valores máximos, sino en los intermedios por eso la nube de puntos es mas heterogénea. La nula o muy baja actividad del bíceps contralateral durante el ciclo se representa en la última columna y concentra la mayoría de los puntos en el eje del resto de músculos, que se activan mientras él pertenece inactivo.

Durante la manipulación se observa como el bíceps contralateral se activa en todo su rango con muy baja actividad por parte del resto de músculos, excepto en el caso del bíceps y pronador. El deltoides y flexor son los que presentan menos actividad durante la manipulación.

Para interpretar la cuantificación de la coactivación ha de valorarse la distribución del porcentaje de valores en la matriz de 16 cuadrantes. Si la suma de los porcentajes se acerca al 100 sumando la primera columna y la última fila, significa que los puntos están distribuidos a lo largo de los ejes de la matriz y representando la condición antagónica que tienen esos dos músculos durante ese período, como puede ser el caso del extensor y el bíceps durante el ciclo. Si esa suma se concentra o bien en la primera columna o bien en la última fila, corresponde a una activación de uno de los músculos mientras el otro durante ese período no presenta actividad, como es el caso del bíceps contralateral y deltoides durante la manipulación. En el caso que la mayoría de los valores se concentren al cuadrante de la primera columna y cuarta fila, se considera que hay una coactivación, aunque a valores muy bajos que posiblemente no contribuyan al movimiento, como ocurre con el flexor y el deltoides durante la manipulación. Si estos valores de porcentajes se distribuyen en la diagonal entre este cuadrante y el primero de la cuarta columna, incluso sumen en este una parte significativa, se considera que los músculos se coactivan, alcanzando su valores máximos a la vez, como ocurre con el extensor y el deltoides durante el ciclo.

# ESTUDIO 3: RESULTADOS

A)



B)

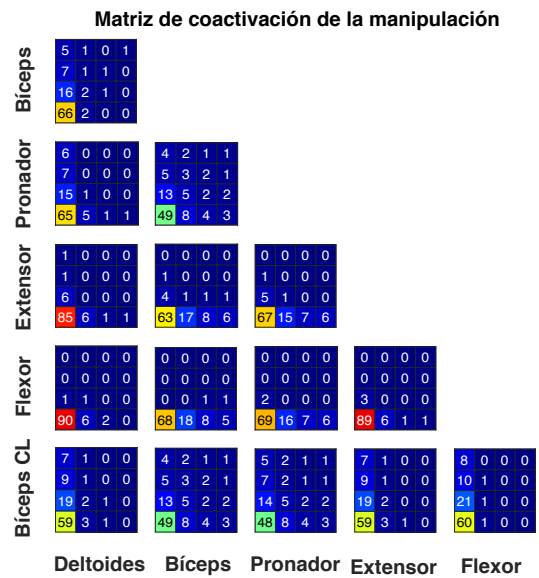
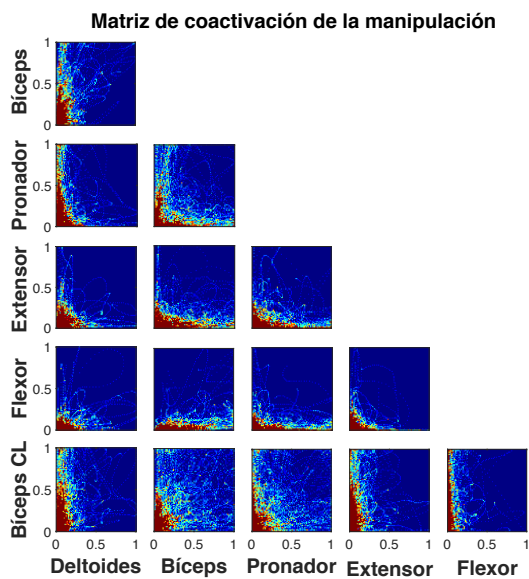


Figura 13: Matriz de coactivación muscular durante el ciclo (A) y durante la manipulación (B) (izquierda), y su respectiva cuantificación según la densidad de puntos en la matriz (derecha).

## DISCUSIÓN

---

### **ANÁLISIS DE VIDEO Y PROCESADO ELECTROMIOGRÁFICO**

En este estudio se han diseñado e implementado algoritmos para procesar y analizar una gran cantidad de datos electromiográficos, correspondientes a movimientos de R&G de modelo animal. Gracias al análisis de los vídeos comportamental ha sido posible identificar, sincronizar y extraer la actividad electromiográfica de músculos selectos de las patas delanteras cuando los roedores realizan el movimiento de R&G. El tamaño de la base de datos creada, que presenta 10 intentos con éxito seleccionados de 10 animales diferentes ha permitido concluir que existe un alto grado de similitud en el reclutamiento muscular durante este movimiento voluntario en los intentos analizados de los distintos animales. Los algoritmos desarrollados se han implementado en Matlab.

De todos los intentos, se han analizado los intentos con acierto, con la finalidad de poder categorizar el reclutamiento muscular en condiciones de salud para posteriormente poder comparar el reclutamiento anómalo o aberrante producido tras una lesión medular, y así, poder cuantificar la pérdida de control motor, o su ganancia mediante terapias rehabilitadoras. Se espera que esta distribución varíe tras una lesión medular debido a la cual los músculos pierdan control motor en mayor o menor medida y comprometan la extensión y flexión de las articulaciones produciendo errores a pesar de sus compensaciones (Mateo 2015)

Uno de los aspectos más relevantes de este estudio ha sido la detección de una mayoría de movimientos exitosos de R&G en los que el animal no libera directamente el pellet en la boca tras la retracción de la pata (Karl 2011), sino que lo manipula de forma variable durante cierto tiempo previamente a su liberación completa en la boca. Su variabilidad de presencia, contenido y duración dependiente de las necesidades de cada movimiento, ha supuesto que haya sido considerado como opción de estudio independiente del ciclo de R&G, que en contraposición es altamente consistente entre movimientos y animales.



### PREPROCESADO DE LAS SEÑALES ELECTROMIOGRÁFICAS

Uno de los criterios bajo los que han sido diseñados los algoritmos es la necesidad de procesar los archivos de forma automática, incluyendo la mayoría de los supuestos particulares de las señales, y poder así analizar gran cantidad de archivos con rapidez y confianza en los resultados obtenidos. Esto ha requerido un continuo proceso de mejora de los algoritmos a medida que se iba descubriendo, desde un punto electromiográfico, más detalles del movimiento.

La alta frecuencia de muestreo original y la gran cantidad de archivos podían suponer un alto coste computacional durante el procesado. Un remuestreo de la señal de 10000Hz a 4800Hz reduce considerablemente esta carga, sin comprometer el contenido frecuencial de la señal como ha quedado demostrado mediante el estudio frecuencial (figura 3). Sigue siendo elevada respecto a otros estudios previos, donde se reduce a 3000Hz e incluso se filtra de 20 a 1000Hz (Castillo-Escario 2019). En este estudio solo se considera necesario eliminar aquello que no corresponda a actividad muscular. En nuestro conocimiento, no existe literatura sobre cuál es la frecuencia de muestreo ideal para señales de actividad muscular registrada con electrodos intramusculares en roedores. Lo que sí se conoce es la proporción inversa de a mayor distancia entre el electrodo y del músculo, menor el rango de frecuencia registrado por el efecto de filtrado que producen los tejidos intermedios. En el caso de los humanos, la banda frecuencial presenta contenido frecuencial hasta los 5kHz mediante electromiografía intramuscular de aguja, mientras que la electromiografía superficial presenta contenido frecuencial hasta 300Hz (Mandrile 2003). En línea con el contenido frecuencial máximo de 5kHz en humanos y el análisis espectral realizado se considera adecuado la reducción de la frecuencia de muestro al valor cercano de 4,8kHz.

Un punto muy importante y delicado es la eliminación del ruido aditivo registrado por los electrodos y que no corresponden con la actividad muscular. Su naturaleza no es conocida y por tanto su composición puede depender de muchos factores experimentales, como pueden ser los propios electrodos, posible fibrina que recubra el electrodo tras su implantación, el recubrimiento de protección y aislante del cableado, sus conexiones, el nivel de superficialidad de

cada uno de ellos, su posición, incluso los aparatos electrónicos presentes en las salas de experimentación (Micera 2010).

Tras varios análisis y pruebas, el ruido presente en las señales musculares se presenta estable dentro de un mismo registro aunque variable entre con los demás. Estos hechos enfocan la búsqueda en un filtrado óptimo Wiener (Pascal Scalart 2021). Los resultados del filtro Wiener son muy positivos, de forma que el ruido basal se elimina adecuadamente según su composición e intensidad en cada uno de los registros (figura 3). La segmentación y extracción de los movimientos de R&G a partir de los registros remuestreados y filtrados, permite crear la base de datos de las señales electromiográficas de todos los intentos seleccionados (458 en total). Se seleccionan 10 de cada animal de forma aleatoria, el máximo de aciertos presentado por el animal #01 (Tabla 1), para obtener una base de datos uniforme de 100 movimientos.

#### PROCESADO DE LA SEÑAL ELECTROMIOGRÁFICA

La naturaleza estocástica de la señal electromiográfica (De luca 1997) de los potenciales de acción musculares aumenta la complejidad del análisis de patrones de actividad muscular poblacional y la comparación entre animales. Por ello se estudian diversas técnicas para realizar un preprocesado de la señal, que permita una representación de la actividad muscular más compacta. Este ha sido un proceso largo e iterativo de diferentes técnicas hasta encontrar aquella que mejor se adapte a las necesidades del estudio y a la variabilidad de la base de datos.

Esta preprocesado no solo debe ajustarse bien visualmente como en el caso de las *envelopes peaks* y *rms*, o el filtrado de *Savitzky-Golay*; sino que debe ser una representación realista de la actividad muscular, tanto en densidad como en amplitud de los potenciales de acción. Además son susceptibles de cambios de umbrales y métodos de ventana que dificultan la labor de algoritmos en la posterior detección de inicio y fin de actividad. El método TKEO, que tiene en cuenta la amplitud y frecuencia de la señal (Kaiser 1990, 1993), se extendió como método para detectar cambios abruptos en señales biológicas (Atit 1999) y minimizar el error en las detecciones de inicio de actividad (Li 2007). Ha sido seleccionado para este estudio como método de preprocesado de la señal, sobretodo por la capacidad de extraer la información real de la actividad muscular, teniendo en cuenta el valor presente pero también los anteriores y

### ESTUDIO 3: DISCUSIÓN

posteriores. Toman presencia los valores bajos y medios menos visibles, resaltando su papel en el reclutamiento. La similitud de mediana es un buen resultado de proporcionalidad del método. El filtro de 12Hz se selecciona como el más adecuado por mantener un equilibrio entre la necesidad de la reducción de fluctuaciones (Frecuencia de corte de 15Hz) y un suavizado excesivo que provoque un alisado extrem de las agrupaciones de actividad (frecuencia de corte 8Hz) (figura 4).

Las técnicas de suavizado y detección de actividad presentan un gran interrelación y han evolucionado conjuntamente durante el estudio. El análisis de cambio de actividad mediante la derivada resulta ser el que mejor se adapta a las particularidades de cada señal. Si las señales lo permiten, es una técnica usada en variedad de señales para detección de eventos (Rangaraj 2015, Kwak 2020, Kohler 2003, Grzegorzcyk 2016). En este estudio se calcula la derivada de las señales y se analiza dentro de una ventana temporal orientativa a partir de los gestos comportamentales. Para definir el inicio de actividad, se busca el instante en el que comienza el cambio de pendiente, que corresponde al paso de la derivada por el valor 0. Su aplicación no requiere de particularidades de las señales, ya que a pesar de introducir un umbral en el cálculo del final del ciclo, este es proporcional a su mínimo absoluto y es extrapolable a todas las señales. Evita posibles errores en señales que presenten bajadas de actividad muy alargadas en el tiempo.

La normalización de los datos en el dominio temporal y amplitud (Halaki 2012), según convenga, es esencial para la comparación entre animales y obtención de parámetros poblacionales, sino dada la diferente longitud vectorial por las diferentes duraciones sería imposible sacar unos resultados con los que caracterizar el movimiento de R&G desde un punto de vista poblacional. No pierde calidad de información, es simplemente una proporción de la versión original.

### **CARACTERIZACIÓN DEL MOVIMIENTO DE R&G**

La caracterización del movimiento de R&G desde el punto de vista electromiográfico permite realizar un complejo análisis que cuantifique diferentes aspectos del reclutamiento temporal de los músculos implicados a nivel

individual de cada movimiento. La agrupación de estos resultados individuales permite así la caracterizar este movimiento a nivel poblacional.

El gran número de muestras aportan robustez al estudio, que además incluye la variabilidad intra e interanimales. Esta variabilidad es interpretada como la representación de una muestra real de un movimiento voluntario que ocurre mientras un animal se mueve libremente por la caja, lo cual fortalece los resultados de caracterización del movimiento.

## ANÁLISIS TEMPORAL

### *DURACIÓN Y LATENCIAS MUSCULARES*

La alta variabilidad de la fase de manipulación ha sido una de las grandes consideraciones que se ha tenido en cuenta para dividir el análisis electromiográfico del movimiento en ciclo y manipulación. El ciclo presentaba una duración y reclutamiento más estable, mientras que la manipulación es muy variable entre movimientos de un mismo animal y entre animales. La posterior manipulación duplica, de media, la duración del movimiento desde respecto al ciclo. La variabilidad de las duraciones del ciclo a nivel individual es menor que la que presenta el ciclo más manipulación.

La latencia muscular, no es tanto una medida de capacidad de reacción sino de ordenamiento de la activación muscular necesario para producir movimiento. Previo a este análisis exhaustivo, por observación, el bíceps o el deltoides se marcaban el inicio movimiento. En cambio el nivel de detalle que permite la electromiografía y el procesado de señales ha permitido identificar la actividad del pronador como músculo que inicia el movimiento. Probablemente mientras la mano aún está en el suelo, el animal tiende a acercar el codo hacia el cuerpo para orientar extremidad superior en dirección hacia la ventana, y esto provoca una primera activación del pronador. La siguiente activación de apenas milésimas de segundo del bíceps y deltoides, indica la activación en paralelo de ambos a la alineación de la pata hacia la ventana para también levantarla del suelo y hacer una posterior extensión de la pata hacia la ventana, lo que requiere la presencia del deltoides para mantener la extensión del hombro. Mientras se produce la extensión de hombro, el extensor digital comienza a activarse para poder llegar a abarcar el pellet entre los dígitos así como el flexor para

### ESTUDIO 3: DISCUSIÓN

posteriormente poder agarrar y trasladar el pellet a la boca. Por último se activa el bíceps contralateral, para acompañar a la otra pata durante la manipulación, soportándola o empujándola hacia la boca, y poder finalmente liberar el pellet en la boca.

Los gestos comportamentales sirven de guía para orientar el análisis electromiográfico, así como para entender mejor el reclutamiento y necesidades de este movimiento previo a estos resultados. Estas dos fuentes de información no deben ser usadas de forma individual sino conjunta, para obtener mejores resultados. El gesto de avance, marcado por la separación de la muñeca del animal del suelo, muestra una primera activación del pronador y bíceps, implicados en el inicio del movimiento alineado y levantando la pata hacia la ventana. Entre el gesto de avance y agarre, se activa el deltoides para producir una fuerte y necesaria extensión del hombro hacia la ventana. Mientras también se activa el extensor de camino al arpegio o máxima extensión, seguido del flexor. Ambos músculos son agonistas y antagonistas en su máximos valores (cuando uno está activo el otro permanece inactivo), aunque coactiva en valores basales. Es por esta razón que el flexor presenta una latencia tan seguida del extensor, una actividad basal que activa el tono muscular mientras el extensor alcanza su máximo. A continuación se detecta el comienzo del agarre, pasados los 0,3 segundos, momento previo en el que los dígitos comienzan a flexionarse, para alcanzar su flexión máxima en la fase de retirada que comienza de media pasados los 0.4 segundos. La liberación comienza alrededor de los 0,6 segundos, de forma simultánea a la activación del bíceps contralateral, que tiene una presencia importante durante la manipulación del pellet.

#### *CENTRO DE GRAVEDAD*

El mínimo o nulo retardo del centro de gravedad del movimiento completo, ciclo más manipulación, en el caso del deltoides y flexor, sobretodo este segundo, demuestra que su actividad muscular mayoritaria se concentra en el ciclo y no participa significativamente durante la manipulación. Por el contrario, la estrategia de reclutamiento de algunos animales durante la manipulación provoca la activación del resto de músculos también durante la manipulación. En el caso del bíceps contralateral, que presenta su actividad al final del ciclo muy cerca del comienzo de la manipulación, el centro de gravedad del ciclo corresponde a la poca actividad que presenta hasta ese instante. Al incluir la

manipulación al cálculo el centro de gravedad se retrasa fuera del ciclo, como puede verse en los resultados individuales.

Las diferencias medias de la latencia y centro de gravedad de cada músculo son una muestra de la distribución de la actividad muscular a lo largo del movimiento. Los resultados muestran una activación muy puntual del flexor durante el ciclo e insignificante presencia en la manipulación. El deltoides y extensor presentan una distribución muy similar con una fuerte activación durante en ciclo y una actividad residual durante la manipulación. El bíceps, a pesar de ser el segundo músculo en activarse, parece presentar actividad residual hasta el final del ciclo que presenta una fuerte activación (durante la retracción del brazo) que desplaza el centro de gravedad hacia el final del ciclo. El bíceps contralateral presenta una pequeña disrupción, ya que en algunos casos el centro de gravedad es previo a su latencia. Esto es debido al cálculo del centro de gravedad que utiliza toda la actividad acumulada desde el inicio hasta el final del ciclo, entre la que se encuentra mucha actividad basal o potenciales de acción esporádicos durante la mayor parte del ciclo. En este tiempo la pata contralateral lateral se encuentra en el suelo y este músculo pueda presentar actividad residual por el bascule del peso del animal sobre ella mientras la otra pata dominante realiza el movimiento de R&G. El algoritmo detecta el inicio del bíceps contralateral cuando se produce un fuerte cambio de actividad, que ocurre hacia el final del ciclo y marca el inicio de su activación para levantar la pata contralateral y contribuir a la manipulación del pellet.

#### ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD

##### *ENERGÍA MUSCULAR*

El análisis de la energía a lo largo del ciclo permite corroborar esta distribución de la actividad muscular y la contribución de cada músculo al ciclo y a la manipulación según sus valores y la estabilización de los mismos. Esta estabilización se traduce en una nula o mínima contribución de reclutamiento muscular durante ese período. Se pueden apreciar las variabilidades interanimales, y su estrategias de reclutamiento.

##### *MATRIZ DE COEFICIENTES DE CORRELACIÓN*

Las señales medias simplificadas por animal ya dejan entrever el alto grado de similitud que hay entre los diferentes animales, aún con peculiaridades de

### ESTUDIO 3: DISCUSIÓN

estrategia propias. Ayudan también a entender mejor los resultados de latencia y centros de gravedad. Matriz de similitud se calcula por un lado de forma individual, entre todos los ciclos (100) de R&G, y a nivel medio, entre el ciclo medio de todos los animales para una mejor apreciación.

Los resultados presentan unos coeficientes muy altos de correlación en todos los músculos, aún con particularidades. No es el caso del bíceps contralateral cuya correlación es difícil por las fluctuaciones de actividad que presentan las señales. Aparte de la activación de este músculo al final del ciclo o incluso fuera del ciclo, la principal razón es una discrepancia durante la normalización de la amplitud. El bíceps contralateral no está activo en todos los ciclos porque el animal puede realizar la liberación del pellet en la boca sin la ayuda de su pata contralateral. Esto mantiene en una actividad basal el músculo y su amplitud es muy baja. Al realizar la normalización al máximo de la amplitud del movimiento (incluyendo la manipulación), que en estos casos de inactividad es muy baja, todas estas pequeñas fluctuaciones basales incrementan mucho su amplitud al pasar al dominio normalizado. Es una peculiaridad que se ha preferido no incluir en el algoritmo porque requiere de la introducción de umbrales y realizar una normalización diferente al resto de músculos. En cambio, esta normalización a la amplificación de todo el movimiento, genera una simplificación realista de la señal y de la estrategia de reclutamiento. En el caso del extensor del animal #13, durante el ciclo solo alcanza el 50% de su amplitud máxima, concentrando su máxima capacidad de reclutamiento durante la manipulación para solventar las necesidades del movimiento. Es importante tener una visión global del ciclo teniendo en cuenta su contexto, como es la manipulación

La matriz de correlación de las manipulaciones no es posible de realizar por las diferentes longitudes que presentan, cuya normalización al 100% del ciclo no soluciona ya que no se pueden comparar vectores de diferente número de muestras.

#### *MATRIZ DE COACTIVACIÓN MUSCULAR*

Cada valor de las señales individuales, normalizados en amplitud y tiempo, de un músculo frente al otro es representado en una matriz, generando una nube de puntos. La distribución de esta nube representa el grado de antagonismo o coactivación que presentan los músculos entre sí durante el ciclo y durante la

manipulación. Para cuantificar la distribución de los puntos se divide cada eje en cuatro filas y columnas, distribuyendo la matriz en 16 cuadrantes. En cada uno se calcula el porcentaje de puntos respecto al total. En otro estudio (Alam 2017) se exploró también el grado de coactivación, en concreto entre el extensor y el flexor durante el R&G, aunque durante todo el movimiento sin diferenciar ciclo de manipulación. Si se suman los resultados de extesor y flexor durante el ciclo y manipulación del presente estudio se obtienen resultados similares a los de Alam et al.





## CONCLUSIONES

---

El diseño de nuevas herramientas computacionales ha permitido realizar un estudio electromiográfico, guiado por un análisis comportamental, del movimiento de alcance y agarre en roedores sanos. Los resultados evidencian desde un punto de vista de reclutamiento muscular el alto grado de similitud de este movimiento a nivel población, que junto con otros trabajos comportamentales y de histología espinal y cortical, proponen la presencia de redes neuronales espinales a nivel cervical generadoras de patrones de reclutamiento musculares en movimientos estereotipados y mantenidos evolutivamente. Por otro lado, estas herramientas permiten cuantificar en diferentes aspectos la función motora de las extremidades superiores, pudiendo evaluar el grado de su pérdida tras una lesión medular y los avances en su recuperación mediante terapias rehabilitadoras.



## BIBLIOGRAFÍA

Alam M, Garcia-Alias G, Jin B, Keyes J, Zhong H, Roy RR, Gerasimenko Y, Lu DC, Edgerton VR. Electrical neuromodulation of the cervical spinal cord facilitates forelimb skilled function recovery in spinal cord injured rats. *Experimental Neurology*. 2017, 291:141-50.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.02.006>

Atit M, Hagan J, Bansal S, Ichord R, Geocadin R, Hansen C, Sherman D, Thakor N. EEG burst detection: performance evaluation. *Proceedings of the First Joint BMES/EMBS Conference. 1999 IEEE Engineering in Medicine and Biology 21st Annual Conference and the 1999 Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society*. 1999, 1: 441

DOI <https://doi.org/10.1109/IEMBS.1999.802519>

Alstermark B, Isa T. Circuits for skilled reaching and grasping. *Annual Review of Neuroscience*. 2012, 35:559-78. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150527>

Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Aliás G, Jané R. Onset Detection to Study Muscle Activity in Reaching and Grasping Movements in Rats. *41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2019, 1:5113-16.

DOI: <https://doi.org/10.1109/EMBC.2019.8857200>

De Luca CJ, Adam A, Wotiz R, Gilmore LD, Nawab SH. Decomposition of surface EMG signals. *Journal of Neurophysiology*. 2006, 96(3):1646-57.

DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00009.2006>

Ganzer PD, Darrow MJ, Meyers EC, Solorzano BR, Ruiz AD, Robertson NM, Adcock KS, James JT, Jeong HS, Becker AM, Goldberg MP, Pruitt DT, Hays SA, Kilgard MP, Rennaker RL 2nd. Closed-loop neuromodulation restores network connectivity and motor control after spinal cord injury. *Elife*. 2018, 7:e32058. DOI: <https://doi.org/10.7554/elife.32058>

IGrzegorzcyk I, Soliński M, Łeppek M, Perka A, Rosiński J, Rymko J. PCG classification using a neural network approach, *2016 Computing in Cardiology Conference (CinC)*, 2016,1129-32.

Halaki M, Ginn K. Normalization of EMG signals: to normalize or not to normalize and what to normalize. *Computational Intelligence in Electromyography Analysis*, 2012. Ch. 7.

Iwaniuk AN, Whishaw IQ. On the origin of skilled forelimb movements. *Trends in Neuroscience*. 2000, 23(8):372-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01618-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01618-0)

Kaiser JF. On a simple algorithm to calculate the 'energy' of a signal, *International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*. 1990, 1:381-84.

DOI: <https://doi.org/10.1109/ICASSP.1990.115702>

Kaiser JF. Some useful properties of Teager's energy operators. *1993 IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 1993, 3: 149-52.

DOI: <https://doi.org/10.1109/ICASSP.1993.319457>

Karl JM, Whishaw IQ. Rodent Skilled Reaching for Modeling Pathological Conditions of the Human Motor System. In: Lane E., Dunnett S. (eds) *Animal Models of Movement Disorders*. Neuromethods, vol 61. *Humana Pres*. 2011. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-298-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-298-4_6)

### ESTUDIO 3: BIBLIOGRAFÍA

- Karl JM, Whishaw IQ. Different evolutionary origins for the reach and the grasp: an explanation for dual visuomotor channels in primate parietofrontal cortex. *Frontiers in Neurology*. 2013, 4:208. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffneur.2013.00208>
- Klein A, Sacrey LA, Whishaw IQ, Dunnett SB. The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2012, 36(3):1030-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.010>
- Köhler BU, Hennig C, Orglmeister R. QRS Detection Using Zero Crossing Counts. *Progress in Biomedical Research*. 2003, 8(3):138-45.
- Kwak JY, Chung YJ. Sound Event Detection Using Derivative Features in Deep Neural Networks. *Applied Sciences*. 2020; 10(14):4911. DOI: <https://doi.org/10.3390/app10144911>
- Lee AS, Cholewicki J, Reeves NP. The effect of background muscle activity on computerized detection of sEMG onset and offset. *Journal of Biomechanics*. 2007, 40(15):3521-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.05.012>
- Li X, Zhou P, Aruin AS. Teager-Kaiser energy operation of surface EMG improves muscle activity onset detection. *Annals of Biomedical Engineering*. 2007, 35(9):1532-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10439-007-9320-z>
- Mandrile F, Farina D, Pozzo M, Merletti R. Stimulation artifact in surface EMG signal: effect of the stimulation waveform, detection system, and current amplitude using hybrid stimulation technique. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*. 2003, 11(4):407-15. DOI: <https://doi.org/10.1109/tnsre.2003.819791>
- Mateo S, Roby-Brami A, Reilly KT, Rossetti Y, Collet C, Rode G. Upper limb kinematics after cervical spinal cord injury: a review. *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*. 2015, 12:9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-0003-12-9>
- Micera S, Carpaneto J, Raspopovic S. Control of hand prostheses using peripheral information. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. 2010, 3:48-68. DOI: <https://doi.org/10.1109/rbme.2010.2085429>
- Pascal Scalart. Wiener filter for noise reduction and speech enhancement. *MATLAB Central File Exchange*. 2021. <https://es.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24462-wiener-filter-for-noise-reduction-and-speech-enhancement>
- Rangaraj MR. Detection of Events, *Biomedical Signal Analysis IEEE*, 2015, 233-93. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119068129.ch4>
- Rodríguez-Cañón M., Jané R., García-Alías G. Temporal recruitment of forelimb proximal and distal muscles during reaching and grasping. En: Libro de Actas de XXXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica. 2017, 1:89-92.
- Rodríguez-Cañón M., Delgado I., Jané R., García-Alías G. Temporal Categorization of Upper Limb Muscle's EMG Activity During Reaching and Grasping. In: Masia L., Micera S., Akay M., Pons J. (eds) *Converging Clinical and Engineering Research on Neurorehabilitation III*. ICNR 2018. Biosystems & Biorobotics. *Springer*. 2018, 21:876-79. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-01845-0\\_176](https://doi.org/10.1007/978-3-030-01845-0_176)
- Sacrey LA, Alaverdashvili M, Whishaw IQ. Similar hand shaping in reaching-for-food (skilled reaching) in rats and humans provides evidence of homology in release, collection, and manipulation movements. *Behavioural Brain Research*. 2009, 204(1):153-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.035>

Solnik S, Rider P, Steinweg K, DeVita P, Hortobágyi T. Teager-Kaiser energy operator signal conditioning improves EMG onset detection. *European Journal of Application Physiology*. 2010, 110(3):489-98. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00421-010-1521-8>

Whishaw IQ, Pellis SM, Gorny BP. Skilled reaching in rats and humans: evidence for parallel development or homology. *Behavioural Brain Research*. 1992, 47(1):59-70. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80252-9](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80252-9)









## DISCUSIÓN

---

La estimulación medular transcutánea ha demostrado ser una técnica segura que produce cambios plásticos en las redes neuronales responsables de movimientos en las extremidades (Megia 2019) inferiores (Hofstoetter 2013,2015, Minassian 2016, Sayenko 2019, Gad 2018, Gerasimenko 2015c) y superiores (Inanici 2018,2021, Freyvert 2018, Gad2018, Kumru 2021a, 2021b), incluso tras una lesión medular. A pesar de los prometedores resultados, aún se desconocen los mecanismos neuronales involucrados en la recuperación del control motor voluntario (Taccola 2018). Esta estimulación se realiza en paralelo a una actividad física (Gerasimenko 2015c, Sayenko 2019, Gad 2018, Inanici 2018), por lo que no es posible discernir en los resultados los efectos individuales producidos por la probable diferencia de reclutamiento de mecanismos biológicos, que aún siendo sinérgicos, puedan contribuir de manera diferente a la reorganización neural. Bajo esta premisa se diseña el estudio 1, en el que se analiza la contribución funcional y neurofisiológica en sujetos sanos la aplicación independiente y combinada de la estimulación subumbral transcutánea y de la actividad física manual.

Los resultados muestran indicios de fatiga muscular tras la actividad física, acompañada de una bajada de excitabilidad a nivel cortical. Esto puede haberse visto compensado y revertido tras su combinación simultánea con la estimulación transcutánea, que provoca un aumento de la fuerza de agarre y la excitabilidad espinal y corticoespinal. La actividad física orienta y mejora la excitabilidad espinal producida por la estimulación de forma aislada. En cambio, la estimulación transcutánea puede revertir los efectos de la reducción de excitabilidad cortical producida por la actividad al actuar sobre uno o varios niveles de la vía corticoespinal. Estos resultados sugieren que la combinación de actividad física con terapias neuromoduladoras pueden inducir cambios plásticos a largo plazo con mayor probabilidad y magnitud que la aplicación individual.

Entre los diferentes estudios realizados hasta el momento, el protocolo de estimulación así como del entrenamiento, es muy variable, y su definición en

## DISCUSIÓN

varios casos subjetiva. La mayoría optaron por la intensidad máxima tolerada por los sujetos, o bien por respuestas musculares observables. De esta forma el rango de intensidades en la literatura se sitúa desde los 10 a los 250 mA (Megía 2019). Este es un punto, que ya previo al diseño del estudio 1, complicaba la interpretación de los resultados sin tener una forma objetiva de repetibilidad de los estudios. No era posible saber si los efectos observados se debían a una facilitación del control motor o bien a una estimulación directa de las motoneuronas al superar su umbral de excitabilidad.

Por ello, en el estudio 1 y 2 se establece una definición de la intensidad estandarizada, al buscar la intensidad a la cual se evocaban más de 5 sobre 10 potenciales motores espinales en el músculo de interés, superando así el umbral motor de reposo espinal (sRMT). La intensidad de aplicación es proporcional al valor de ésta. La estimulación al 90% de la intensidad que marca el umbral motor, y por lo tanto subumbral, tiene unos efectos positivos en el funcionalidad y excitabilidad espinal y cortico espinal al combinarla con una actividad física al máximo de la capacidad del individuo (estudio 1). En el estudio 2 se analiza la posibilidad de una modulación diferente dependiendo de la intensidad de la estimulación eléctrica transcutánea así como de la actividad física realizada, como se plantea en el segundo estudio. Los resultados muestran que una menor intensidad de estimulación o de actividad no modula positivamente al sistema, produciendo incluso las tendencias negativas respecto a su valor basal. La aplicación de estimulación intensidad supraumbral induce cambios que provocan una excitabilidad cortical superior, aunque la estimulación subumbral al 90% del umbral motor presenta mejores resultados en la función y fuerza manual, y excitabilidad espinal. Los circuitos espinales y corticoespinales son así modulables a diferentes intensidades de estimulación eléctrica y actividad física, lo cual debe ser considerado en el diseño de los protocolos de rehabilitación motor.

A pesar de ello aún son necesarios mas estudios futuros que puedan definir la ventana temporal de aplicación de esta combinación de estudios dentro de los protocolos de rehabilitación, el número de sesiones o la duración de las mismas, para así evaluar los efectos a largo plazo de estas nuevas terapias neuromoduladoras.

Para evaluar esos efectos es necesario una cuantificación que en el estudio 1 y 2, se realiza mediante parámetros funcionales y mediciones neurofisiológicas. En este sentido, durante años ha sido validado un modelo animal en roedores como modelo traslacional a humanos para el estudio del control motor de las extremidades superiores por sus homologías evolutivas. Este modelo corresponde al cotidiano movimiento de alcanzar y agarrar cualquier objeto, tan automatizado en el ser humano que lo convierte en indispensable para la realización de la mayoría de las actividades diarias. Esta homología ha justificado el estudio *ex vivo* para tratar de mejorar el entendimiento de las redes neuronales tanto espinales como corticales responsables de este movimiento tan estereotipado, y mejorar así las respuesta terapéuticas de una lesión medular.

En el estudio 3 se presenta el diseño de herramientas computacionales que permitan cuantificar los efectos musculares en las extremidades superiores después de una lesión medular y evaluar así el grado de pérdida de control motor. Mediante el estudio de las señales electromiográficas musculares del brazo, se realiza una caracterización de la actividad muscular del movimiento de alcance y agarre en sujetos sanos. Todo ello supone un estudio electromiográfico muy exhaustivo, guiado por el estudio comportamental del movimiento, que puede ayudar a su vez al entendimiento de los circuitos espinales y corticoespinales involucrados en el desarrollo de este movimiento. Esta caracterización se considera de referencia para la cuantificación de la pérdida de control motor tras una lesión medular y analizar su evolución durante los procesos de rehabilitación, entre los que estaría la estimulación transcutánea.

La lesión puede provocar un cambio de patrones de reclutamiento de los músculos según las motoneuronas que se hayan visto afectadas y/o una compensación del resto de músculos, acompañada de una reorganización neuronal que provoque la participación de otras neuronas previamente no involucradas. El movimiento puede verse enlentecido y presentar una mayor activación muscular aunque no funcional por las conexiones aberrantes producidas por el sistema tras la lesión.

Este estudio demuestra un muy alto grado de similitud entre los patrones de reclutamiento muscular a nivel de población. Esto justifica la hipótesis de que el movimiento de Reaching and Grasping pertenezca a uno de los patrones de

## DISCUSIÓN

reclutamiento almacenado en un centro generador de patrones a nivel cervical. Cabe la posibilidad que sea suficiente una única orden cortical para que se lleve a cabo el movimiento bajo la voluntad del sujeto. La corteza enviaría la orden, relegando la realización del movimiento en los circuitos medulares, donde se activa el generador de este patrón de activación muscular. Este centro sería sensible a las aferencias sensitivas para adaptarse al contexto ambiental. Solo y cuando este movimiento necesita de modificaciones mayores a este patrón de reclutamiento, y requiera movimientos específicos del control cortical, actúan las redes neuronales corticales enviando órdenes de activación concreta de los músculos involucrados. Esto podría ser lo que esté ocurriendo durante la manipulación siguiente al ciclo de R&G. El reclutamiento muscular durante el ciclo es altamente repetitivo en tiempo y estrategia de reclutamiento, previsiblemente controlada por una red específica medular. En cambio, el reclutamiento durante la manipulación no responde a un mismo patrón de actividad y se adapta a las necesidades del movimiento. Puede ser ésta un indicio de un control menos automatizado y más adaptado a las necesidades de cada momento bajo un control más cortical. Más estudios son necesarios para abordar esta hipótesis.





## CONCLUSIONES

---

El trabajo presentado en esta tesis contribuye a clarificar la estructura y función de circuitos neuronales en la médula espinal cervical en sujetos sanos humanos y roedores. Se presentan herramientas de evaluación y resultados que pueden ayudar a los profesionales sanitarios en el abordaje de la rehabilitación motora de las extremidades superiores tras una lesión medular.

En este sentido, se han alcanzado los objetivos marcados y se concluye que:

- La estimulación eléctrica facilitadora del control motor (eEmc) aplicada a nivel cervical de forma no invasiva, ha demostrado modificar la excitabilidad de las redes neuronales responsables del movimiento de las extremidades superiores en personas sanas tras una única sesión. Su combinación con la actividad física manual ha mejorado en sujetos sanos la fuerza de agarre de la mano y la excitabilidad espinal y corticoespinal al provocar cambios plásticos inmediatos en las redes neuronales que se mantienen incluso una hora después.
- La intensidad de la estimulación eléctrica transcutánea y de la actividad física modula de forma diferente los diferentes niveles de la vía corticoespinal, por lo que debe ser tenida en consideración para optimizar los protocolos de rehabilitación de la función motora. Se plantea que esta diferente incidencia puede estar relacionada con la superación o no el umbral motor espinal por parte de la intensidad de corriente aplicada. Para una mejor repetibilidad e interpretación de los resultados de los estudios futuros, se recomienda la definición del umbral motor espinal.
- El modelo de alcance y agarre es un modelo traslacional entre roedores y humanos debido a su homología demostrada en diferentes aspectos. El estudio de la electromiografía junto con el análisis comportamental ha



## CONCLUSIONES

permitido caracterizar el patrón de reclutamiento muscular de este movimiento en roedores sanos. Se ha evidenciado un alto grado de similitud en la ejecución de los distintos gestos del movimiento, lo que sugiere su control por circuitos medulares, de forma similar a al control de la locomoción en la medula lumbar.





## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ajiboye AB, Willett FR, Young DR, Memberg WD, Murphy BA, Miller JP, Walter BL, Sweet JA, Hoyen HA, Keith MW, Peckham PH, Simeral JD, Donoghue JP, Hochberg LR, Kirsch RF. Restoration of reaching and grasping movements through brain-controlled muscle stimulation in a person with tetraplegia: a proof-of-concept demonstration. *Lancet*. 2017, 389(10081):1821-30. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30601-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30601-3)
- Alam M, García-Alías G, Jin B, Keyes J, Zhong H, Roy RR, Gerasimenko Y, Lu DC, Edgerton VR. Electrical neuromodulation of the cervical spinal cord facilitates forelimb skilled function recovery in spinal cord injured rats. *Experimental Neurology*. 2017, 291:141-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.02.006>
- Alstermark B, Isa T. Circuits for skilled reaching and grasping. *Annual Review of Neuroscience*. 2012, 35:559-78. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150527>
- Angeli CA, Edgerton VR, Gerasimenko YP, Harkema SJ. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain*. 2014, 137(5):1394-409. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awu038>
- Angeli CA, Boakye M, Morton RA, Vogt J, Benton K, Chen Y, Ferreira CK, Harkema SJ. Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury. *The New England Journal of Medicine*. 2018, 379, 1244–50. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1803588>
- Atit M, Hagan J, Bansal S, Ichord R, Geocadin R, Hansen C, Sherman D, Thakor N. EEG burst detection: performance evaluation. *Proceedings of the First Joint BMES/EMBS Conference. 1999 IEEE Engineering in Medicine and Biology 21st Annual Conference and the 1999 Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society*. 1999, 1: 441 DOI: <https://doi.org/10.1109/IEMBS.1999.802519>
- Baker SN, Perez MA. Reticulospinal Contributions to Gross Hand Function after Human Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience* 2017,4;37(40):9778-9784. DOI: <https://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3368-16.2017>
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nature Neuroscience*. 2004, 7(3):269-77. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn1195>
- Basinger H, Hogg JP. Neuroanatomy, Brainstem. *StatPearls*, StatPearls Publishing, 8 May 2021. [NBK544297](https://doi.org/10.1016/j.upt.000000000000184)
- Beauparlant J, van den Brand R, Barraud Q, Friedli L, Musienko P, Dietz V, Courtine G. Undirected compensatory plasticity contributes to neuronal dysfunction after severe spinal cord injury. *Brain*. 2013, 136(11):3347-61. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awt204>
- Behrman AL, Ardolino EM, Harkema SJ. Activity-Based Therapy: From Basic Science to Clinical Application for Recovery After Spinal Cord Injury. *Journal of Neurologic Physical Therapy*. 2017, 41(Suppl 3 IV STEP Spec Iss):S39-45. DOI: <https://doi.org/10.1097/npt.000000000000184>

## BIBLIOGRAFÍA

- Benavides FD, Jo HJ, Lundell H, Edgerton VR, Gerasimenko Y, Perez MA. Cortical and Subcortical Effects of Transcutaneous Spinal Cord Stimulation in Humans with Tetraplegia. *Journal of Neuroscience*. 2020, 40(13):2633-2643. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2374-19.2020>
- Bennet MR, Hacker MS. *Philosophical Foundation of Neuroscience*. Wiley-Blackwell. 2003.
- Bestmann, S.; Krakauer, J.W. The uses and interpretations of the motor-evoked potential for understanding behaviour. *Experimental Brain Research*. 2015, 233: 679–89. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00221-014-4183-7>
- Bilchak JN, Caron G, Côté MP. Exercise-Induced Plasticity in Signaling Pathways Involved in Motor Recovery after Spinal Cord Injury. *International journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(9):4858. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms22094858>
- Bonizzato M, Pidpruzhnykova G, DiGiovanna J, Shkorbatova P, Pavlova N, Micera S, Courtine G. Brain-controlled modulation of spinal circuits improves recovery from spinal cord injury. *Nature Communications*. 2018, 9(1):3015. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05282-6>
- Bouton CE, Shaikhouni A, Annetta NV, Bockbrader MA, Friedenber DA, Nielson DM, Sharma G, Sederberg PB, Glenn BC, Mysiw WJ, Morgan AG, Deogaonkar M, Rezai AR. Restoring cortical control of functional movement in a human with quadriplegia. *Nature*. 2016, 533(7602):247-50. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature17435>
- Buccolieri A, Abbruzzese G, Rothwell JC. Relaxation from a voluntary contraction is preceded by increased excitability of motor cortical inhibitory circuits. *Journal of Physiology*. 2004, 558(2):685-95. DOI: <https://dx.doi.org/10.1113%2Fjphysiol.2004.064774>
- Burke RE; Edgerton VR. Motor unit properties and selective involvement in movement. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 1975, 3:31–82.
- Calvert JS, Manson GA, Grahn PJ, Sayenko DG. Preferential activation of spinal sensorimotor networks via lateralized transcutaneous spinal stimulation in neurologically intact humans. *Journal of Neurophysiology*. 2019, 122(5):2111-18. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00454.2019>
- Capogrosso M, Wenger N, Raspopovic S, Musienko P, Beauparlant J, Bassi Luciani L, Courtine G, Micera S. A computational model for epidural electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits. *The Journal of Neuroscience*. 2013, 33(49):19326-40. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1688-13.2013>
- Capogrosso M, Milekovic T, Borton D, Wagner F, Moraud EM, Mignardot JB, Buse N, Gandar J, Barraud Q, Xing D, Rey E, Duis S, Jianzhong Y, Ko WK, Li Q, Detemple P, Denison T, Micera S, Bezaud E, Bloch J, Courtine G. A brain-spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates. *Nature*. 2016, 539(7628):284-88. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20118>
- Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Onset Detection to Study Muscle Activity in Reaching and Grasping Movements in Rats. *41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2019, 1:5113-16, DOI: <https://doi.org/10.1109/EMBC.2019.8857200>
- Chakravarthy K, Richter H, Christo PJ, Williams K, Guan Y. Spinal Cord Stimulation for Treating Chronic Pain: Reviewing Preclinical and Clinical Data on Paresthesia-Free High-Frequency Therapy. *Neuromodulation*. 2018, 21(1):10-18. DOI: <https://doi.org/10.1111/ner.12721>

- Côté MP, Murray M, Lemay MA. Rehabilitation Strategies after Spinal Cord Injury: Inquiry into the Mechanisms of Success and Failure. *Journal of Neurotrauma*. 2017, 34(10):1841-1857. DOI: <https://dx.doi.org/10.1089%2Fneu.2016.4577>
- Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR, Sofroniew MV. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nature Medicine*. 2008, 14(1):69-74. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1682>
- Courtine G, Gerasimenko Y, van den Brand R, Yew A, Musienko P, Zhong H, Song B, Ao Y, Ichiyama RM, Lavrov I, Roy RR, Sofroniew MV, Edgerton VR. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nature Neuroscience*. 2009, 12(10):1333-42. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2401>
- Courtine G, Sofroniew MV. Spinal cord repair: advances in biology and technology. *Nature Medicine*. 2019, 25(6):898-908. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>
- Danner SM, Hofstoetter US, Ladenbauer J, Rattay F, Minassian K. Can the human lumbar posterior columns be stimulated by transcutaneous spinal cord stimulation? A modeling study. *Artificial Organs*. 2011, 35(3):257-62. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2011.01213.x>
- Danner SM, Hofstoetter US, Minassian K. Finite Element Models of Transcutaneous Spinal Cord Stimulation. In: Encyclopedia of Computational Neuroscience. Springer. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6>
- Danner SM, Hofstoetter US, Freundl B, Binder H, Mayr W, Rattay F, Minassian K. Human spinal locomotor control is based on flexibly organized burst generators. *Brain*. 2015, 138(Pt 3):577-88. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awu372>
- Davidoff RA. The pyramidal tract. *Neurology*. 1990, 40(2), 332. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.40.2.332>
- De Luca CJ, Adam A, Wotiz R, Gilmore LD, Nawab SH. Decomposition of surface EMG signals. *Journal of Neurophysiology*. 2006, 96(3):1646-57. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00009.2006>
- Di Lazzaro V, Oliviero A, Profice P, Pennisi MA, Di Giovanni S, Zito G, Tonali P, Rothwell JC. Muscarinic receptor blockade has differential effects on the excitability of intracortical circuits in the human motor cortex. *Experimental Brain Research*. 2000, 135(4):455-61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002210000543>
- Dietz V. Do human bipeds use quadrupedal coordination?. *Trends in neurosciences*. 2002, 25(9): 462-67. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02229-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02229-4)
- Dietz V. Behavior of spinal neurons deprived of supraspinal input. *Nature Reviews Neurology*. 2010, 6(3):167-74. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.227>
- Dimitrijevic MR, Gerasimenko Y, Pinter MM. Evidence for a spinal central pattern generator in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998, 860:360-76. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09062.x>
- Donati AR, Shokur S, Morya E, Campos DS, Muioli RC, Gitti CM, Augusto PB, Tripodi S, Pires CG, Pereira GA, Brasil FL, Gallo S, Lin AA, Takigami AK, Aratanha MA, Joshi S, Bleuler H, Cheng G, Rudolph A, Nicolelis MA. Long-Term Training with a Brain-Machine Interface-Based Gait Protocol Induces Partial Neurological Recovery in Paraplegic Patients. *Scientific Reports*. 2016, 11;6:30383. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep30383>

## BIBLIOGRAFÍA

- Duysens J, Van de Crommert HW. Neural control of locomotion; The central pattern generator from cats to humans. *Gait & posture*. 1998, 7(2): 131–41. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0966-6362\(97\)00042-8](https://doi.org/10.1016/s0966-6362(97)00042-8)
- Edgerton VR, Tillakaratne NJ, Bigbee AJ, de Leon RD, Roy RR. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annual Review of Neuroscience*. 2004, 27:145-67. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144308>
- Espiritu MG, Lin CS, Burke D. Motoneuron excitability and the F wave. *Muscle & Nerve*. 2003, 27(6):720-7. DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.10388>
- Fawcett JW. The Paper that Restarted Modern Central Nervous System Axon Regeneration Research. *Trends in Neuroscience*. 2018, 41(5):239-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.02.012>
- Fischer I, Dulin JN, Lane MA. Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020, 21(7):366-83. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0314-2>
- Formento E, Minassian K, Wagner F, Mignardot JB, Le Goff-Mignardot CG, Rowald A, Bloch J, Micera S, Capogrosso M, Courtine G. Electrical spinal cord stimulation must preserve proprioception to enable locomotion in humans with spinal cord injury. *Nature Neuroscience*. 2018, 21(12):1728-41. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0262-6>
- Freyvert Y, Yong NA, Morikawa E, Zdunowski S, Sarino ME, Gerasimenko Y, Edgerton VR, Lu DC. Engaging cervical spinal circuitry with non-invasive spinal stimulation and buspirone to restore hand function in chronic motor complete patients. *Scientific Reports*. 2018, 8(1):15546. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038%2Fs41598-018-33123-5>
- Gad PN, Kreydin E, Zhong H, Latack K, Edgerton VR. Non-invasive Neuromodulation of Spinal Cord Restores Lower Urinary Tract Function After Paralysis. *Frontiers in Neuroscience*. 2018, 12:432. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffnins.2018.00432>
- Ganapathy MK, Reddy V, Tadi P. Neuroanatomy, Spinal Cord Morphology. *StatPearls*, StatPearls Publishing, 8 Nov 2020. [NBK545206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348545206/)
- Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiological Reviews*. 2001, 81(4):1725-89. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1725>
- Ganzer PD, Darrow MJ, Meyers EC, Solorzano BR, Ruiz AD, Robertson NM, Adcock KS, James JT, Jeong HS, Becker AM, Goldberg MP, Pruitt DT, Hays SA, Kilgard MP, Rennaker RL 2nd. Closed-loop neuromodulation restores network connectivity and motor control after spinal cord injury. *Elife*. 2018, 7:e32058. DOI: <https://doi.org/10.7554/elife.32058>
- Gao M, Lu P, Bednark B, Lynam D, Conner JM, Sakamoto J, Tuszynski MH. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection. *Biomaterials*. 2013, 34(5):1529-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.070>
- Gassert R, Dietz V. Rehabilitation robots for the treatment of sensorimotor deficits: a neurophysiological perspective. *Journal of Neuroengineering Rehabilitation*. 2018, 15(1):46. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12984-018-0383-x>
- Gerasimenko Y, Gorodnichev R, Puhov A, Moshonkina T, Savochin A, Selionov V, Roy RR, Lu DC, Edgerton VR. Initiation and modulation of locomotor circuitry output with multisite transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord in noninjured humans. *Journal of Neurophysiology*. 2015, 113(3):834-42. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00609.2014>

- Gerasimenko Y, Gorodnichev R, Moshonkina T, Sayenko D, Gad P, Edgerton VR. Transcutaneous electrical spinal-cord stimulation in humans. *Annals of physical and rehabilitation medicine*. 2015, 58(4): 225–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2015.05.003>
- Gerasimenko YP, Lu DC, Modaber M, Zdunowski S, Gad P, Sayenko DG, Morikawa E, Haakana P, Ferguson AR, Roy RR, Edgerton VR. Noninvasive Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis. *Journal of Neurotrauma*. 2015, 32(24):1968-80. DOI: <https://dx.doi.org/10.1089%2Fneu.2015.4008>
- Gerasimenko Y, Sayenko D, Gad P, Kozesnik J, Moshonkina T, Grishin A, Pukhov A, Moiseev S, Gorodnichev R, Selionov V, Kozlovskaya I, Edgerton VR. Electrical Spinal Stimulation, and Imagining of Lower Limb Movements to Modulate Brain-Spinal Connectomes That Control Locomotor-Like Behavior. *Frontiers in Physiology*. 2018, 9:1196. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffphys.2018.01196>
- Gill ML, Grahn PJ, Calvert JS, Linde MB, Lavrov IA, Strommen JA, Beck LA, Sayenko DG, Van Straaten MG, Drubach DI, Veith DD, Thoreson AR, Lopez C, Gerasimenko YP, Edgerton VR, Lee KH, Zhao KD. Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia. *Nature Medicine*. 2018, 24(11):1677-82. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0175-7>
- Gomes-Osman J, Field-Fote EC. Cortical vs. afferent stimulation as an adjunct to functional task practice training: a randomized, comparative pilot study in people with cervical spinal cord injury. *Clinical Rehabilitation*. 2015, 29(8):771-82. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269215514556087>
- Gomes-Osman J, Tibbett JA, Poe BP, Field-Fote EC. Priming for Improved Hand Strength in Persons with Chronic Tetraplegia: A Comparison of Priming-Augmented Functional Task Practice, Priming Alone, and Conventional Exercise Training. *Frontiers in Neurology*. 2017, 7:242. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00242>
- Gorgey AS. Robotic exoskeletons: The current pros and cons. *World Journal of Orthopedics*. 2018,9(9):112-19. DOI: <https://doi.org/10.5312/wjo.v9.i9.112>
- Gorodnichev RM, Pivovarova EA, Pukhov A, Moiseev SA, Savokhin AA, Moshonkina TR, Shcherbakova NA, Kilimnik VA, Selionov VA, Kozlovskaya IB, Edgerton VR, Gerasimenko IuP. [Transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord: non-invasive tool for activation of locomotor circuitry in human]. *Fiziologiya Cheloveka*. 2012, 38(2):46-56.
- Grahn PJ, Lavrov IA, Sayenko DG, Van Straaten MG, Gill ML, Strommen JA, Calvert JS, Drubach DI, Beck LA, Linde MB, Thoreson AR, Lopez C, Mendez AA, Gad PN, Gerasimenko YP, Edgerton VR, Zhao KD, Lee KH. Enabling Task-Specific Volitional Motor Functions via Spinal Cord Neuromodulation in a Human With Paraplegia. *Mayo Clinic Proceedings*. 2017, 92(4):544-554. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.02.014>
- Grasmücke D, Zierjacks A, Jansen O, Fisahn C, Sczesny-Kaiser M, Wessling M, Meindl RC, Schildhauer TA, Aach M. Against the odds: what to expect in rehabilitation of chronic spinal cord injury with a neurologically controlled Hybrid Assistive Limb exoskeleton. A subgroup analysis of 55 patients according to age and lesion level. *Neurosurgical Focus*. 2017, 42(5):E15. DOI: <https://doi.org/10.3171/2017.2.focus171>
- Greiner N, Barra B, Schiavone G, Lorach H, James N, Conti S, Kaeser M, Fallegger F, Borgognon S, Lacour S, Bloch J, Courtine G, Capogrosso M. Recruitment of upper-limb motoneurons with epidural electrical stimulation of the cervical spinal cord. *Nature Communications*. 2021, 12(1):435. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20703-1>



## BIBLIOGRAFÍA

- Grzegorzczuk I, Soliński M, Łeppek M, Perka A, Rosiński J, Rymko J. PCG classification using a neural network approach, *2016 Computing in Cardiology Conference (CinC)*, 2016,1129-32.
- Guertin PA. Central pattern generator for locomotion: anatomical, physiological, and pathophysiological considerations. *Frontiers in neurology*. 2013. 3 (183). DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00183>
- Guiho T, Baker SN, Jackson A. Epidural and transcutaneous spinal cord stimulation facilitates descending inputs to upper-limb motoneurons in monkeys. *Journal of Neural Engineering*. 2021, 18(4):046011. DOI: <https://doi.org/10.1088/1741-2552/abe358>
- Halaki M, Ginn K. Normalization of EMG signals: to normalize or not to normalize and what to normalize. *Computational Intelligence in Electromyography Analysis*, 2012. Ch. 7.
- Hamdy S, Rothwell JC, Aziz Q, Singh KD, Thompson DG. Long-term reorganization of human motor cortex driven by short-term sensory stimulation. *Nature Neuroscience*. 1998, 1(1):64-8. DOI: <https://doi.org/10.1038/264>
- Harkema SJ. Plasticity of interneuronal networks of the functionally isolated human spinal cord. *Brain Research Reviews*. 2008, 57(1):255-64. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.brainresrev.2007.07.012>
- Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira C, Willhite A, Rejc E, Grossman RG, Edgerton VR. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet*. 2011, 377(9781):1938-47. DOI:[https://dx.doi.org/10.1016%2FS0140-6736\(11\)60547-3](https://dx.doi.org/10.1016%2FS0140-6736(11)60547-3)
- Holinski BJ, Mazurek KA, Everaert DG, Toossi A, Lucas-Osma AM, Troyk P, Etienne-Cummings R, Stein RB, Mushahwar VK. Intraspinal microstimulation produces over-ground walking in anesthetized cats. *Journal of Neural Engineering*. 2016, 13(5):056016. DOI: <https://doi.org/10.1088/1741-2560/13/5/056016>
- Hofstoetter US, Minassian K, Hofer C, Mayr W, Rattay F, Dimitrijevic MR. Modification of reflex responses to lumbar posterior root stimulation by motor tasks in healthy subjects. *Artificial Organs*. 2008, 32(8):644-8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00616.x>
- Hofstoetter US, Hofer C, Kern H, Danner SM, Mayr W, Dimitrijevic MR, Minassian K. Effects of transcutaneous spinal cord stimulation on voluntary locomotor activity in an incomplete spinal cord injured individual. *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering*. 2013, 58 Suppl 1. DOI: <https://doi.org/10.1515/bmt-2013-4014>
- Hofstoetter US, Krenn M, Danner SM, Hofer C, Kern H, McKay WB, Mayr W, Minassian K. Augmentation of Voluntary Locomotor Activity by Transcutaneous Spinal Cord Stimulation in Motor-Incomplete Spinal Cord-Injured Individuals. *Artificial Organs*. 2015, 39(10):E176-86. DOI: <https://doi.org/10.1111/aor.12615>
- Hofstoetter US, Freundl B, Binder H, Minassian K. Common neural structures activated by epidural and transcutaneous lumbar spinal cord stimulation: Elicitation of posterior root-muscle reflexes. *PLoS One*. 2018, 13(1):e0192013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192013>
- Hunter SK, McNeil CJ, Butler JE, Gandevia SC, Taylor JL. Short-interval cortical inhibition and intracortical facilitation during submaximal voluntary contractions changes with fatigue. *Experimental Brain Research*. 2016, 234(9):2541-51. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00221-016-4658-9>

- Inanici F, Samejima S, Gad P, Edgerton VR, Hofstetter CP, Moritz CT. Transcutaneous Electrical Spinal Stimulation Promotes Long-Term Recovery of Upper Extremity Function in Chronic Tetraplegia. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2018, 26(6):1272-78. DOI: <https://dx.doi.org/10.1109%2FTNSRE.2018.2834339>
- Inanici F, Brighton LN, Samejima S, Hofstetter CP, Moritz CT. Transcutaneous Spinal Cord Stimulation Restores Hand and Arm Function After Spinal Cord Injury. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*. 2021, 29:310-19. DOI: <https://doi.org/10.1109/tnsre.2021.3049133>
- Iwaniuk AN, Whishaw IQ. On the origin of skilled forelimb movements. *Trends in Neuroscience*. 2000, 23(8):372-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01618-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01618-0)
- Jamil A, Batsikadze G, Kuo HI, Labruna L, Hasan A, Paulus W, Nitsche MA. Systematic evaluation of the impact of stimulation intensity on neuroplastic after-effects induced by transcranial direct current stimulation. *The Journal of Physiology*. 2017, 595(4):1273-88. DOI: <https://doi.org/10.1113/jp272738>
- Jin MC, Medress ZA, Azad TD, Doulames VM, Veeravagu A. Stem cell therapies for acute spinal cord injury in humans: a review. *Neurosurgical Focus*. 2019, 46(3):E10. DOI: <https://doi.org/10.3171/2018.12.focus18602>
- Jin B, Alam M, Tierno A, Zhong H, Roy RR, Gerasimenko Y, Lu DC, Edgerton VR. Serotonergic Facilitation of Forelimb Functional Recovery in Rats with Cervical Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*. 2021, 18(2):1226-1243. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00974-8>
- Jiang YQ, Zaaami B, Martin JH. Competition with primary sensory afferents drives remodeling of corticospinal axons in mature spinal motor circuits. *Journal of Neuroscience*. 2016, 36: 193–203. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-15.2016>
- Jung JH, Lee HJ, Cho DY, Lim JE, Lee BS, Kwon SH, Kim HY, Lee SJ. Effects of Combined Upper Limb Robotic Therapy in Patients With Tetraplegic Spinal Cord Injury. *Annals of Rehabilitation Medicine*. 2019, 43(4):445-457. DOI: <https://dx.doi.org/10.5535%2Farm.2019.43.4.445>
- Kadoya K, Lu P, Nguyen K, Lee-Kubli C, Kumamaru H, Yao L, Knackert J, Poplawski G, Dulin JN, Strobl H, Takashima Y, Biane J, Conner J, Zhang SC, Tuszynski MH. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nature Medicine*. 2016, 22(5):479-87. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4066>
- Kaiser JF. On a simple algorithm to calculate the 'energy' of a signal, *International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*. 1990, 1:381-84. DOI: <https://doi.org/10.1109/ICASSP.1990.115702>
- Kaiser JF. Some useful properties of Teager's energy operators. *1993 IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 1993, 3: 149-52. DOI: <https://doi.org/10.1109/ICASSP.1993.319457>
- Kaiser JT, Lugo-Pico JG. Neuroanatomy, Spinal Nerves. *StatPearls*, StatPearls Publishing; 31 Jul 2021. [NBK542218](https://doi.org/10.5535%2Farm.2019.43.4.445)
- Kakulas BA, Kaelan C. The neuropathological foundations for the restorative neurology of spinal cord injury. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2015, 129 (Suppl 1):S1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.01.012>
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of Neural Science. *McGraw Hill Professional*. 2013

## BIBLIOGRAFÍA

- Karabanov A, Thielscher A, Siebner HR. Transcranial brain stimulation: closing the loop between brain and stimulation. *Current Opinion in Neurology*. 2016, 29(4):397-404. DOI: <https://dx.doi.org/10.1097%2FWCO.0000000000000342>
- Karl JM, Whishaw IQ. Rodent Skilled Reaching for Modeling Pathological Conditions of the Human Motor System. In: Lane E., Dunnett S. (eds) *Animal Models of Movement Disorders. Neuromethods, Humana Pres.* 2011, 61. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-298-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-298-4_6)
- Karl JM, Whishaw IQ. Different evolutionary origins for the reach and the grasp: an explanation for dual visuomotor channels in primate parietofrontal cortex. *Frontiers in Neurology*. 2013, 4:208. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffneur.2013.00208>
- Kasten MR, Sunshine MD, Secrist ES, Horner PJ, Moritz CT. Therapeutic intraspinal microstimulation improves forelimb function after cervical contusion injury. *Journal of Neural Engineering*. 2013, 10(4):044001. DOI: <https://dx.doi.org/10.1088%2F1741-2560%2F10%2F4%2F044001>
- Kiehn O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*. 2006, 29: 279-306. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112910>
- Klein A, Sacrey LA, Whishaw IQ, Dunnett SB. The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2012, 36(3):1030-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.010>
- Knikou M. Neural control of locomotion and training-induced plasticity after spinal and cerebral lesions. *Clinical Neurophysiology*. 2010, 121:1655–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2010.01.039>
- Köhler BU, Hennig C, Orglmeister R. QRS Detection Using Zero Crossing Counts. *Progress in Biomedical Research*. 2003, 8(3):138-45.
- Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *Journal of Physiology*. 1993, 471:501-19. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019912>
- Kumru H, Flores Á, Rodríguez-Cañón M, Edgerton VR, García L, Benito-Penalva J, Navarro X, Gerasimenko Y, García-Alías G, Vidal J. Cervical Electrical Neuromodulation Effectively Enhances Hand Motor Output in Healthy Subjects by Engaging a Use-Dependent Intervention. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, 10(2):195. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10020195>
- Kumru H, Rodríguez-Cañón M, Edgerton VR, García L, Flores Á, Soriano I, Opisso E, Gerasimenko Y, Navarro X, García-Alías G, Vidal J. Transcutaneous Electrical Neuromodulation of the Cervical Spinal Cord Depends Both on the Stimulation Intensity and the Degree of Voluntary Activity for Training. A Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, 10(15):3278. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10153278>
- Kwak JY, Chung YJ. Sound Event Detection Using Derivative Features in Deep Neural Networks. *Applied Sciences*. 2020; 10(14):4911 DOI: <https://doi.org/10.3390/app10144911>
- Ladenbauer J, Minassian K, Hofstoetter US, Dimitrijevic MR, Rattay F. Stimulation of the human lumbar spinal cord with implanted and surface electrodes: a computer simulation study. *IEEE transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*. 2010, 18(6):637-45. DOI: <https://doi.org/10.1109/tnsre.2010.2054112>
- Lang N, Siebner HR, Ernst D, Nitsche MA, Paulus W, Lemon RN, Rothwell JC. Preconditioning with transcranial direct current stimulation sensitizes the motor cortex to

- rapid-rate transcranial magnetic stimulation and controls the direction of after-effects. *Biological Psychiatry*. 2004;56(9):634-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.07.017>
- Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche MA, Paulus W, Rothwell JC, Lemon RN, Frackowiak RS. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *The European Journal of Neuroscience*. 2005, 22(2):495-504. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04233.x>
- Le Gal JP, Colnot E, Cardoit L, Bacqué-Cazenave J, Thoby-Brisson M, Juvin L, Morin D. Modulation of respiratory network activity by forelimb and hindlimb locomotor generators. *The European journal of neuroscience*. 2020, 52(4): 3181–95. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejn.14717>
- Lee AS, Cholewicki J, Reeves NP. The effect of background muscle activity on computerized detection of sEMG onset and offset. *Journal of Biomechanics*. 2007, 40(15):3521-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.05.012>
- Li X, Zhou P, Aruin AS. Teager-Kaiser energy operation of surface EMG improves muscle activity onset detection. *Annals of Biomedical Engineering*. 2007, 35(9):1532-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10439-007-9320-z>
- Long J, Federico P, Pérez MA. A novel cortical target to enhance hand motor output in humans with spinal cord injury. *Brain*. 2017, 140(6):1619-32. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awx102>
- Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, Brock J, Blesch A, Rosenzweig ES, Havton LA, Zheng B, Conner JM, Marsala M, Tuszynski MH. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell*. 2012, 14, 150(6):1264-73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.020>
- Lu DC, Edgerton VR, Modaber M, AuYong N, Morikawa E, Zdunowski S, Sarino ME, Sarrafzadeh M, Nuwer MR, Roy RR, Gerasimenko Y. Engaging Cervical Spinal Cord Networks to Reenable Volitional Control of Hand Function in Tetraplegic Patients. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2016, 30(10):951-62. DOI: <https://doi.org/10.1177/1545968316644344>
- MacKay-Lyons M. Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence. *Physical therapy*. 2002, 82(1): 69–83. DOI: <https://doi.org/10.1093/ptj/82.1.69>
- Mandrile F, Farina D, Pozzo M, Merletti R. Stimulation artifact in surface EMG signal: effect of the stimulation waveform, detection system, and current amplitude using hybrid stimulation technique. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*. 2003, 11(4):407-15. DOI: <https://doi.org/10.1109/tnsre.2003.819791>
- Marieb EN. Anatomía y fisiología humana. *Universitario, Pearson* 2008, 24.
- Maruyama A, Matsunaga K, Tanaka N, Rothwell JC. Muscle fatigue decreases short-interval intracortical inhibition after exhaustive intermittent tasks. *Clinical Neurophysiology*. 2006, 117(4):864-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.12.019>
- Mateo S, Roby-Brami A, Reilly KT, Rossetti Y, Collet C, Rode G. Upper limb kinematics after cervical spinal cord injury: a review. *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*. 2015, 12:9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-0003-12-9>
- Mathiowetz V, Volland G, Kashman N, Weber K. Adult Norms for the Box and Block Test of Manual Dexterity. *The American Journal of Occupational Therapy*. 1985, 39:386–91. DOI: <https://doi.org/10.5014/ajot.39.6.386>

## BIBLIOGRAFÍA

- Megía García A, Serrano-Muñoz D, Taylor J, Avendaño-Coy J, Gómez-Soriano J. Transcutaneous Spinal Cord Stimulation and Motor Rehabilitation in Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2020, 34(1):3-12. DOI: <https://doi.org/10.1177/1545968319893298>
- Mesrati F, Vecchierini MF. F-waves: neurophysiology and clinical value. *Neurophysiologie Clinique*. 2004, 34(5):217-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2004.09.005>
- Micera S, Carpaneto J, Raspopovic S. Control of hand prostheses using peripheral information. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. 2010, 3:48-68. DOI: <https://doi.org/10.1109/rbme.2010.2085429>
- Miller S, Van Der Burg J, Van Der Meché F. Coordination of movements of the hindlimbs and forelimbs in different forms of locomotion in normal and decerebrate cats. *Brain research*. 1975, 91(2):217-37. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90544-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90544-2)
- Milosevic M, Masugi Y, Sasaki A, Sayenko DG, Nakazawa K. On the reflex mechanisms of cervical transcutaneous spinal cord stimulation in human subjects. *Journal of Neurophysiology*. 2019, 121(5):1672-79. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00802.2018>
- Minassian K, Persy I, Rattay F, Dimitrijevic MR, Hofer C, Kern H. Posterior root-muscle reflexes elicited by transcutaneous stimulation of the human lumbosacral cord. *Muscle & Nerve*. 2007, 35(3):327-36. DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.20700>
- Minassian K, Hofstoetter US. Spinal Cord Stimulation and Augmentative Control Strategies for Leg Movement after Spinal Paralysis in Humans. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2016, 22(4):262-70. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111%2Fcns.12530>
- Minassian K, Hofstoetter US, Dzeladini F, Guertin PA, Ijspeert A. The Human Central Pattern Generator for Locomotion: Does It Exist and Contribute to Walking?. *Neuroscientist*. 2017, 23(6):649-63. DOI: <https://doi.org/10.1177/1073858417699790>
- Minev IR, Musienko P, Hirsch A, Barraud Q, Wenger N, Moraud EM, Gandar J, Capogrosso M, Milekovic T, Asboth L, Torres RF, Vachicouras N, Liu Q, Pavlova N, Duis S, Larmagnac A, Vörös J, Micera S, Suo Z, Courtine G, Lacour SP. Biomaterials. Electronic dura mater for long-term multimodal neural interfaces. *Science*. 2015, 347(6218):159-63. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1260318>
- Monte-Silva K, Kuo MF, Hessenthaler S, Fresnoza S, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA. Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain Stimulation*. 2013, 6(3):424-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brs.2012.04.011>
- Moritz C. A giant step for spinal cord injury research. *Nature Neuroscience*. 2018, 21:1647-48. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0264-4>
- Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RL, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ, Fouad K. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Nature Medicine*. 2010, 16(6):694-700. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2160>
- Nam HS, Koh S, Kim YJ, Beom J, Lee WH, Lee SU, Kim S. Biomechanical Reactions of Exoskeleton Neurorehabilitation Robots in Spastic Elbows and Wrists. *IEEE Transactions on Neural Systems Rehabilitation Engineering*. 2017, 25(11):2196-2203. DOI: <https://doi.org/10.1109/tnsre.2017.2714203>

- Nitsche MA, Doemkes S, Karaköse T, Antal A, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W. Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *Journal of Neurophysiology*. 2007, 97(4):3109-17. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.01312.2006>
- Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971, 9(1):97-113. DOI: [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(71\)90067-4](https://doi.org/10.1016/0028-3932(71)90067-4)
- Overman JJ, Carmichael ST. Plasticity in the injured brain: more than molecules matter. *The Neuroscientist*. 2014, 20(1):15-28. DOI: <https://doi.org/10.1177/1073858413491146>
- O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017, 1;127(9):3259-70. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci90608>
- Parhizi B, Barss TS, Mushahwar VK. Simultaneous Cervical and Lumbar Spinal Cord Stimulation Induces Facilitation of Both Spinal and Corticospinal Circuitry in Humans. *Frontiers in neuroscience*. 2021, 15: 615103. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.615103>
- Pascal Scalart. Wiener filter for noise reduction and speech enhancement. *MATLAB Central File Exchange*. 2021. <https://es.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24462-wiener-filter-for-noise-reduction-and-speech-enhancement>
- Penfield W, Boldrey E. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*. 1937, 60 (4): 389-443. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/60.4.389>
- Pitcher JB, Miles TS. Alterations in corticospinal excitability with imposed vs. voluntary fatigue in human hand muscles. *Journal of Applied Physiology*. 2002, 92(5):2131-8. DOI: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00835.2001>
- Radhakrishna M, Steuer I, Prince F, Roberts M, Mongeon D, Kia M, Dyck S, Matte G, Vaillancourt M, Guertin PA. Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Phase I/IIa Study (Safety and Efficacy) with Buspirone/Levodopa/Carbidopa (Spinalon™) in Subjects with Complete AIS A or Motor-Complete AIS B Spinal Cord Injury. *Current Pharmaceutical Design*. 2017, 23(12):1789-1804. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612822666161227152200>
- Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001, 2(4):263-73. DOI: <https://doi.org/10.1038/35067570>
- Rangaraj MR. Detection of Events, *Biomedical Signal Analysis IEEE*, 2015, 233-93. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119068129.ch4>
- Rodríguez-Cañón M., Jané R., García-Alías G. Temporal recruitment of forelimb proximal and distal muscles during reaching and grasping. *Libro de Actas de XXXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica*. 2017, 1:89-92. <https://seib.org.es/publicaciones-cientificas-caseib/>
- Rodríguez-Cañón M., Delgado I., Jané R., García-Alías G. Temporal Categorization of Upper Limb Muscle's EMG Activity During Reaching and Grasping. In: Masia L., Micera S., Akay M., Pons J. (eds) *Converging Clinical and Engineering Research on Neurorehabilitation III*. ICNR 2018. Biosystems & Biorobotics. Springer. 2018, 21:876-79. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-01845-0\\_176](https://doi.org/10.1007/978-3-030-01845-0_176)
- Rosenzweig ES, Courtine G, Jindrich DL, Brock JH, Ferguson AR, Strand SC, Nout YS, Roy RR, Miller DM, Beattie MS, Havton LA, Bresnahan JC, Edgerton VR, Tuszynski MH. Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury. *Nature Neuroscience*. 2010, 13(12):1505-10. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2691>

## BIBLIOGRAFÍA

- Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, Kumamaru H, Salegio EA, Kadoya K, Weber JL, Liang JJ, Moseanko R, Hawbecker S, Huie JR, Havton LA, Nout-Lomas YS, Ferguson AR, Beattie MS, Bresnahan JC, Tuszynski MH. Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord. *Nature Medicine*. 2018, 24(4):484-90.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4502>
- Rossignol S, Frigon A. Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*. 2011, 34:413-40.  
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113746>
- Roy FD, Gibson G, Stein RB. Effect of percutaneous stimulation at different spinal levels on the activation of sensory and motor roots. *Experimental Brain Research*. 2012, 223(2):281-9.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00221-012-3258-6>
- Sabbahi Ma, Sengul YS. Cervical multisegmental motor responses in healthy subjects. *Nature Spinal Cord*. 2012, 50: 432:39. DOI: <https://doi.org/10.1038/sc.2011.166>
- Sacrey LA, Alaverdashvili M, Whishaw IQ. Similar hand shaping in reaching-for-food (skilled reaching) in rats and humans provides evidence of homology in release, collection, and manipulation movements. *Behavioural Brain Research*. 2009, 204(1):153-61.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.035>
- Sayenko DG, Atkinson DA, Dy CJ, Gurley KM, Smith VL, Angeli C, Harkema SJ, Edgerton VR, Gerasimenko YP. Spinal segment-specific transcutaneous stimulation differentially shapes activation pattern among motor pools in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2015,118(11):1364-74. DOI: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01128.2014>
- Sayenko DG, Rath M, Ferguson AR, Burdick JW, Havton LA, Edgerton VR, Gerasimenko YP. Self-Assisted Standing Enabled by Non-Invasive Spinal Stimulation after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2019, 36(9):1435-1450. DOI: <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5956>
- Schättin A, Gennaro F, Egloff M, Vogt S, de Bruin ED. Physical Activity, Nutrition, Cognition, Neurophysiology, and Short-Time Synaptic Plasticity in Healthy Older Adults: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018, 10:242.  
DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffnagi.2018.00242>
- Shah M, Peterson C, Yilmaz E, Halalmeh DR, Moisi M. Current advancements in the management of spinal cord injury: A comprehensive review of literature. *Surgical Neurology International*. 2020, 11 (2). DOI: [https://doi.org/10.25259/sni\\_568\\_2019](https://doi.org/10.25259/sni_568_2019)
- Smith AC, Knikou M. A Review on Locomotor Training after Spinal Cord Injury: Reorganization of Spinal Neuronal Circuits and Recovery of Motor Function. *Neural Plasticity*. 2016, 2016:1216258. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/1216258>
- Snell RS. Clinical Neuroanatomy. *Wolters Kluwer Health*. 2010
- Solnik S, Rider P, Steinweg K, DeVita P, Hortobágyi T. Teager-Kaiser energy operator signal conditioning improves EMG onset detection. *European Journal of Application Physiology*. 2010, 110(3):489-98. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00421-010-1521-8>
- Stein RB, Gossen ER, Jones KE. Neuronal variability: noise or part of the signal? *Nature Reviews Neuroscience*. 2005, 6(5):389-97. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn1668>
- Taccola G, Sayenko D, Gad P, Gerasimenko Y, Edgerton VR. And yet it moves: Recovery of volitional control after spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*. 2018; 160: 64-81.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.004>
- Taylor JL, Butler JE, Gandevia SC. Changes in muscle afferents, motoneurons and motor drive during muscle fatigue. *European Journal of Applied Physiology*. 2000, 83(2-3):106-15.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s004210000269>

Thomas CK, Johansson RS, Bigland-Ritchie B. Incidence of F waves in single human thenar motor units. *Muscle & Nerve*. 2002, 25(1):77-82. DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.10005>

van den Brand R, Heutschi J, Barraud Q, DiGiovanna J, Bartholdi K, Huerlimann M, Friedli L, Vollenweider I, Moraud EM, Duis S, Dominici N, Micera S, Musienko P, Courtine G. Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science*. 2012 1,336(6085):1182-5. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1217416>

Wagner FB, Mignardot JB, Le Goff-Mignardot CG, Demesmaeker R, Komi S, Capogrosso M, Rowald A, Seáñez I, Caban M, Pirondini E, Vat M, McCracken LA, Heimgartner R, Fodor I, Watrin A, Seguin P, Paoles E, Van Den Keybus K, Eberle G, Schurch B, Pralong E, Becce F, Prior J, Buse N, Buschman R, Neufeld E, Kuster N, Carda S, von Zitzewitz J, Delattre V, Denison T, Lambert H, Minassian K, Bloch J, Courtine G. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. *Nature*. 2018, 563(7729):65-71.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0649-2>

Weber F. The diagnostic sensitivity of different F wave parameters. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 1998, 65(4):535-40. DOI: <https://doi.org/10.1136/jnnp.65.4.535>

Whishaw IQ, Pellis SM, Gorny BP. Skilled reaching in rats and humans: evidence for parallel development or homology. *Behavioural Brain Research*. 1992, 47(1):59-70.

DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80252-9](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80252-9)

Wilson JR, Forgiione N, Fehlings MG. Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury. *Canadian Medical Association Journal*. 2013, 185(6):485-92.

DOI: <https://doi.org/10.1503/cmaj.121206>

World Medical Association. World Medical Association World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA*. 2013, 310 : 2191-94.

DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>

Wu YK, Levine JM, Wecht JR, Maher MT, LiMonta JM, Saeed S, Santiago TM, Bailey E, Kastuar S, Guber KS, Yung L, Weir JP, Carmel JB, Harel NY. Posteroanterior cervical transcutaneous spinal stimulation targets ventral and dorsal nerve roots. *Clinical Neurophysiology*. 2020, 131(2):451-460. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.11.056>

Yates SK, Brown WF. Characteristics of the F response: a single motor unit study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 1979, 42(2):161-70.

DOI: <https://doi.org/10.1136/jnnp.42.2.161>

Yu K, Rong W, Li J, Jia L, Yuan W, Yie X, Shi Z. Neurophysiological evidence of spared upper motor conduction fibers in clinically complete spinal cord injury: discomplete SCI in rats. *Journal of Neurological Science*. 2001, 189(1-2):23-36.

DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(01\)00545-7](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00545-7)

Zareen N, Shinozaki M, Ryan D, Alexander H, Amer A, Truong DQ, Khadka N, Sarkar A, Naeem S, Bikson M, Martin JH. Motor cortex and spinal cord neuromodulation promote corticospinal tract axonal outgrowth and motor recovery after cervical contusion spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2017, 297:179-89.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.004>

Zhang F, Momeni K, Ramanujam A, Ravi M, Carnahan J, Kirshblum S, Forrest GF. Cervical Spinal Cord Transcutaneous Stimulation Improves Upper Extremity and Hand Function in People With Complete Tetraplegia: A Case Study. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*. 2020, 28(12):3167-74.

DOI: <https://doi.org/10.1109/tnsre.2020.3048592>









María Rodríguez-Cañón  : <https://orcid.org/0000-0003-4093-5292>

### PUBLICACIONES

- *Artículo tcSCS intensidades JCM, Julio 2021*

Kumru H, Rodríguez-Cañón M, Edgerton VR, García L, Flores Á, Soriano I, Opisso E, Gerasimenko Y, Navarro X, García-Alías G, Vidal J. Transcutaneous Electrical Neuromodulation of the Cervical Spinal Cord Depends Both on the Stimulation Intensity and the Degree of Voluntary Activity for Training. A Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, 10(15): 3278.

DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10153278>

- *Artículo tcSCS combinación JCM, Enero 2021*

Kumru H, Flores Á, Rodríguez-Cañón M, Edgerton VR, García L, Benito-Penalva J, Navarro X, Gerasimenko Y, García-Alías G, Vidal J. Cervical Electrical Neuromodulation Effectively Enhances Hand Motor Output in Healthy Subjects by Engaging a Use-Dependent Intervention. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, 10(2): 195. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10020195>

- *Artículo Revista Española de Neurología, Julio 2020*

Kumru H, Flores A, Rodríguez-Cañón M, Soriano I, García L, Vidal-Samsó J. Estimulación no invasiva cerebral y medular para la recuperación motora y funcional tras una lesión medular [Non-invasive brain and spinal cord stimulation for motor and functional recovery after aspinal cord injury]. *Revista de neurología*. 2020, 70(12): 461–477.

DOI: <https://doi.org/10.33588/rn.7012.2019453>

- *Artículo Sinergias IEEE Access, Marzo 2020*

Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Identifying Muscle Synergies From Reaching and Grasping Movements in Rats. *IEEE Access*. 2020, 8: 62517-30. DOI: <https://doi.org/10.1109/access.2020.2984471>

## ACTIVIDAD CIENTÍFICA

- *Artículo conferencia EMBC, Julio 2019*

Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Onset Detection to Study Muscle Activity in Reaching and Grasping Movements in Rats. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*. 2019, 2019: 5113-16. DOI: <https://doi.org/10.1109/embc.2019.8857200>

- *Artículo conferencia International Conference of NeuroRehabilitation (ICNR), Octubre 2018*

Rodríguez-Cañón M, Delgado I, Jané R, García-Alías G. Temporal Categorization of Upper Limb Muscle's EMG Activity During Reaching and Grasping. In: Masia L, Micera S, Akay M, Pons J. (eds) *Converging Clinical and Engineering Research on Neurorehabilitation III. ICNR 2018. Biosystems & Biorobotics*. Springer. 2019, 21: 876-79. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-01845-0\\_176](https://doi.org/10.1007/978-3-030-01845-0_176)

- *Artículo conferencia CASEIB, Noviembre 2017*

Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Temporal recruitment of forelimb proximal and distal muscles during reaching and grasping. *XXXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica*. 2017, 1: 89-92. ISBN: 978-84-9082-797-0. <https://seib.org.es/publicaciones-cientificas-caseib/>

## PÓSTERS

- *Póster ISCoS, Noviembre 2019 (Niza)*

Kumru H, Flores A, Rodríguez-Cañón M, Soriano I, García L, Vidal-Samsó J, García-Alías G. Cervical transcutaneous spinal cord stimulation increases hand motor strength and function in healthy subjects. Presentado en sesión de pósters de 58 International Spinal Cord Society Annual Scientific Meeting (ISCoS). Niza, Francia. 2019.

- *Póster CASEIB, Noviembre 2019 (Santander)*

Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Detección de los inicios de actividad y estudio de las latencias musculares en movimientos de la extremidad superior en ratas. Presentado en sesión de pósteres de XXXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica. Santander, España. 2019.

- *Póster Congreso Paraplejia, Octubre 2019 (A Coruña)*

García L, Rodríguez-Cañón M, Kumru H, Flores A, Soriano I, Benito J, Opisso E, Medina J, García-Alías G, Vidal-Samsó J. La intensidad de la estimulación transcutánea cervical de la medula influye en la función motora de la mano de sujetos sin afectación neurológica. Presentado en sesión de pósteres en el Congreso Paraplejia 2019: XXXVI Jornadas Nacionales de la Sociedad Española de Paraplejia y XXV Edición del Simposio de la Asociación Española de Enfermería Especializada en Lesión Medular. A Coruña, España. 2019.

- *IBEC Symposium, Julio 2019 (Barcelona)*

Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Onset Detection to Study Muscle Activity in Reaching and Grasping Movements in Rats. Presentado en sesión de poster del 12<sup>th</sup> IBEC Symposium "Bioengineering for Active Aging". Barcelona, España. 2019. \*Premiado al mejor poster del simposio.

- *Póster EMBC, Julio 2019 (Berlín)*

Castillo-Escario Y, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Onset Detection to Study Muscle Activity in Reaching and Grasping Movements in Rats. Presentado en sesión de pósteres de 2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). Berlin, Alemania. 2019.

- *Pósters SSNR, Septiembre 2018 (Vigo)*

Rodríguez-Cañón M, Delgado I, Jané R, García-Alías G. Temporal Categorization of Upper Limb Muscle's EMG Activity During Reaching and Grasping. Presentado en sesión de pósteres de 2018 Summer School of Neurorehabilitation SSNR. Baiona (Vigo), España. 2018.

Zamorano Ng Teajan C, Rodríguez-Cañón M, García-Alías G. Architecture of the spinal networks involved in task specific motor control. Presentado en sesión de pósteres de 2018 summer School of Neurorehabilitation SSNR. Baiona (Vigo), España. 2018.

- *Póster SENC septiembre 2017 (Alicante) y CASEIB diciembre 2017 (Bilbao)*

Rodríguez-Cañón M, García-Alías G, Jané R. Temporal recruitment of forelimb proximal and distal muscles during reaching and grasping. Presentado en sesión

## ACTIVIDAD CIENTÍFICA

de pósters del XVII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia (SENC). Alicante, España; y en sesión de pósters de XXXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB). Bilbao, España. 2017.

## PONENCIAS

- *Jornades del Institut de Neurociències, octubre 2019 (Girona)*

Neurophysiological evaluation of the brain-to-spinal cord connectivity

- *Festival Pint of Science España, mayo 2018 (Barcelona)*

García-Alías G, Baylo O, Zamorano C, Rodríguez-Cañón M, Vidal J. Un traje de robocob para volver a usar las manos. *Pint of Science España*. 2018

<https://pintofscience.es/event/un-traje-de-robocop-para-volver-a-usar-las-manos>

- *YOMO, febrero 2018 (Barcelona)*

García-Alías G, Baylo O, Rodríguez-Cañón M. Recuperant el moviment: neurociència i tecnologia després d'un dany a la medulla espinal. *The Youth Mobile Festival (YOMO)*. Mobile World Congress 2018. Barcelona, España. 2018.

## ASISTENCIAS

- XXXI JORNADAS TÉCNICAS DEL INSTITUT GUTTMANN, sobre Neurotecnología y Rehabilitación. Estrategias innovadoras y personalizadas en la práctica clínica. Octubre 2019. Barcelona, España.
- JORNADES INSTITUT DE NEUROCIÈNCIES, octubre 2019 (Girona).
- JORNADES INSTITUT DE NEUROCIÈNCIES, octubre 2018 (Girona).
- SSNR, septiembre 2018 (Baiona).
- ISCORE, noviembre 2017 (Barcelona).
- CASEIB, noviembre 2017 (Bilbao).
- SENC, septiembre 2017 (Alicante).







