

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

ANALISI DEL SEGNALE EEG A RIPOSO
IN AMBIENTE ACQUATICO

Elaborato in

Laboratorio di Strumentazione Biomedica

Relatore

Prof. Maurizio Lannocca

Presentato da

Gabriele Bordinò

Correlatore

Dott. Anna Lisa Mangia

II Sessione

Anno Accademico 2016/2017

Indice

Introduzione	3
1. Elettroencefalogramma (EEG)	6
2. Dispositivo di acquisizione: OpenBCI	9
3. Sessione sperimentale	16
3.1 <i>Esperimenti</i>	16
3.2 <i>Soggetti</i>	17
3.3 <i>Registrazione EEG</i>	17
3.4 <i>Dispositivo BCI</i>	19
4. Elaborazione dei dati	21
4.1 <i>BLOCCO I</i>	22
4.2 <i>BLOCCO II</i>	23
4.3 <i>BLOCCO III</i>	26
5. Analisi statistica	29
6. Risultati	35
7. Discussione	38
Conclusioni	43
Bibliografia	44

Prefazione

Oggetto del presente studio, è stata l'analisi del segnale elettroencefalografico, con lo scopo di determinare se l'immersione del corpo in acqua potesse in qualche modo alterare l'attività neuronale rispetto alla condizione a secco.

Nell'introduzione è stata riportata una panoramica su quello che, oggigiorno, è la riabilitazione in acqua. Sulla base di risultati di esperimenti conseguiti in altre trattazioni, si cerca di valutare, in prima approssimazione, se i benefici terapeutici indotti dall'immersione possano estendersi non solo ad aspetti legati alla fisica, ma anche a fattori correlati all'attività neuronale.

Il capitolo 1 introduce e descrive l'elettroencefalogramma, lo standard per il posizionamento degli elettrodi, noto come Sistema Internazionale 10-20, ed i ritmi caratterizzanti questo tipo di segnale.

Nel capitolo 2 viene descritto il dispositivo di acquisizione OpenBCI e le sue features. In particolare verranno presentate le potenzialità del circuito integrato ADS1299, i montaggi per il set-up di acquisizione del segnale EEG, ed il software di gestione del dispositivo, OpenBCI GUI.

Nel capitolo 3 viene presentato il protocollo sperimentale impiegato nella realizzazione degli esperimenti.

Il capitolo 4 presenta la fase di elaborazione del segnale EEG. Essa è suddivisa in tre blocchi principali, ognuno dei quali ha funzionalità diverse. Il blocco I consente di ottenere le singole prove a partire dalla registrazione originale. Il blocco II si occupa di un'analisi nel dominio del tempo (filtraggio, suddivisione in epoche, detrend). Il blocco III di un'analisi nel dominio delle frequenze (finestratura Hamming, FFT, PSD), atto a ricavare la potenza spettrale nelle bande theta, alfa, beta1, beta2 e beta3.

Nel capitolo 5 viene eseguita l'analisi statistica sui dati elaborati, come descritto nel precedente capitolo. Una volta verificata la non gaussianità dei dati a nostra disposizione, è stato effettuato il Kruskal-Wallis test, corrispondente non parametrico dell'ANOVA.

Il capitolo 6 espone i risultati ottenuti dall'analisi statistica.

Nel capitolo 7 è stata affrontata una discussione sui risultati ottenuti, motivandoli e illustrando i principi alla loro base. Sono state inoltre avanzate ipotesi, anche sulla base di risultati ottenuti in altre trattazioni, delle possibili applicazioni nel campo della riabilitazione neuromotoria.

Infine sono presentate le conclusioni dello studio, e proposti miglioramenti del set-up sperimentale.

Introduzione

L'immersione in acqua ha come principali effetti le variazioni di alcuni parametri fisici, come temperatura e pressione idrostatica. Il modificarsi di tali parametri induce delle reazioni fisiologiche, come una maggiore vascolarizzazione dei tessuti (vasodilatazione, aumento volume d'effusione) ed un migliore condizionamento aerobico (ossigenazione dei tessuti, riduzione capacità funzionale residua). L'acqua riduce inoltre il peso corporeo grazie alla spinta idrostatica che esercita su un corpo in immersione, facilitando la deambulazione e alleggerendo il carico gravante sulle articolazioni; diminuisce la tensione a cui sono soggetti i muscoli spinali, migliorando l'equilibrio e la propriocezione. La viscosità dell'acqua permette di realizzare esercizi senza l'impiego di sovraccarichi, poiché la resistenza al movimento offerta dal fluido varia a seconda della velocità e della superficie del corpo che si desidera spostare. I benefici terapeutici portati dall'immersione in acqua, hanno contribuito alla diffusione di questa tecnica negli ultimi trenta anni nelle procedure di riabilitazione nel settore ortopedico e di recupero delle attività del quotidiano vivere in pazienti emiplegici.



Figura 1: riabilitazione ortopedica in acqua.

Non è chiaro tuttavia quale sia l'effetto dell'immersione in acqua sull'attività neuronale, e se possa, in qualche modo, avere esiti positivi sul processo riabilitativo.

I benefici su pazienti di neurologia portati dall'immersione in acqua suggeriscono che essa possa influenzare il processamento corticale. Questa ipotetica modulazione può essere valutata attraverso potenziali evocati a breve latenza (SEPs), segnali elettrici di durata compresa tra i 20 ms ed i 40 ms che originano nelle aree di Brodmann 3b e 1 durante input talamo-corticali. L'area 3b riceve informazioni somato-sensitive, che vengono elaborate e ritrasmesse verso le aree 1 e 2, ma anche verso le aree motorie, tramite neuroni corticali. Le connessioni talamo-corticali (CTC) sono

essenziali per una risposta neuronale ai vari tipi di stimoli sensoriali; ciò giustifica la perdita di sensibilità delle aree primarie in presenza di lesioni talamiche in pazienti emiplegici e non.

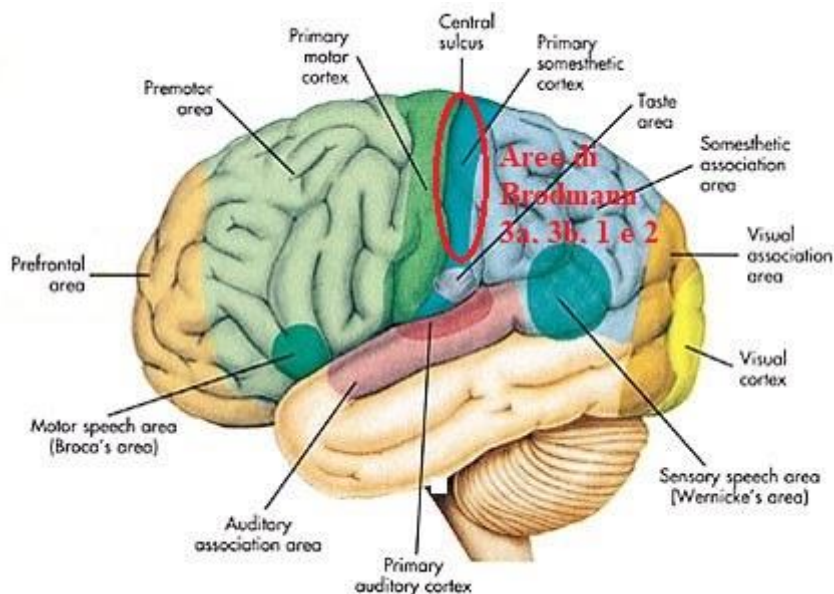


Figura 2: in rosso è cerchiata la corteccia somestesica primaria, nota anche come corteccia somato-sensoriale primaria (S1); essa è suddivisa nelle aree di Brodmann 3a, 3b, 1 e 2.

Studi condotti in passato hanno già dimostrato come delle interferenze sensoriali di tipo tattile e di pressione cutanea attenuino i SEPs a breve latenza generati dalle aree 3b ed 1. Dato che l'acqua agisce come forma multimodale di stimolo sensoriale (sensazione tattile dal contatto con l'acqua, pressione idrostatica, ...), è possibile che anch'essa possa rendersi protagonista di questo effetto. Questa ipotesi potrebbe essere confermata dal fatto che siano stati registrati degli effetti modulatori su componenti dei SEPs a breve latenza di cui è nota l'origine nelle regioni parietale (P25) e centrale (P45), suggerendo che l'immersione possa influenzare il processamento corticale dello stimolo somato sensoriale proveniente da nervi periferici [1].

Un'ulteriore prova a favore dell'ipotesi avanzata, è stata ottenuta mediante l'impiego della tecnologia fNIRS (spettroscopia funzionale del vicino infrarosso), tecnica non invasiva per la valutazione di cambiamenti del flusso ematico cerebrale. L'immersione in acqua è associata ad un incremento dell'apporto di emoglobina ossigenata in prossimità delle aree somato sensoriale primaria (S1), parietale associativa (PAA), motoria supplementare (SMA) e motoria primaria (M1) [2], che includono le aree 3b ed 1. L'input sensoriale scatenato dall'immersione in acqua incrementa dunque l'attivazione di alcune aree corticali e subcorticali dell'encefalo, in particolar modo aumentando la sensibilità della corteccia sensoriale e della corteccia motoria, il che potrebbe facilitare l'apprendimento o il recupero di skills motorie durante la riabilitazione [2].

L'immersione in acqua aumenta inizialmente l'attività delle aree S1 e PAA, e successivamente l'attività delle aree M1 e SMA. Questo suggerisce, a prova di quanto affermato fino ad ora, che l'attivazione corticale innescata da un input sensoriale parta dall'area somato-sensoriale, per poi essere trasmessa verso l'area motoria attraverso vie cortico-corticali e talamo-corticali, grazie ad un cambiamento nell'efficienza sinaptica e nell'organizzazione motoria e sensorimotoria [3].

Approfondimenti e nuovi studi per una maggiore comprensione dei meccanismi di integrazione e modulazione sensoriale, dei processi che incrementano l'attività della corteccia responsabile dell'apprendimento motorio, nonché degli effetti prodotti dall'immersione accompagnata da un flusso d'acqua investente il paziente, che comportano un notevole aumento dell'eccitabilità corticospinale e intracorticale [4], possono portare allo sviluppo di nuove terapie applicabili non più nel solo campo ortopedico, ma anche nella riabilitazione neuromotoria.

Fine ultimo della trattazione, è verificare la presenza di eventuali differenze nell'attività corticale in prossimità delle aree somato sensoriali e motorie al modificarsi della condizione ambientale: a secco, immersione in acqua. Tali differenze sono state valutate attraverso un'analisi nel dominio delle frequenze del segnale EEG, registrato tramite sedici elettrodi posti sullo scalpo e posizionati secondo lo standard del Sistema Internazionale 10-20. L'analisi in frequenza ha permesso di calcolare lo spettro di densità di potenza, da cui è stato possibile estrapolare le potenze nelle singole bande di frequenza tra i 4 ed i 30 Hz. Queste ultime sono state utilizzate per il calcolo statistico. In particolare si è voluto valutare se la condizione ambientale fosse determinante nel modificare in modo significativo (aumento o diminuzione) l'attività in banda alfa, spesso associata anche all'attività motoria e sensori-motoria (oltre a quella occipitale che non sarà in alcun modo oggetto del presente studio).

1. Elettroencefalogramma (EEG)

L'elettroencefalogramma è la misura dell'andamento dei potenziali elettrici del cervello realizzata per mezzo di elettrodi posti sullo scalpo. Il segnale EEG rappresenta la differenza di potenziale tra due elettrodi; quello di riferimento, posto solitamente su un orecchio, e quello adibito alla registrazione del segnale utile e posto sulla zona d'interesse dello scalpo. Un ulteriore elettrodo di massa viene aggiunto al set up per stabilire il potenziale zero del dispositivo di acquisizione.



Figura 3: set up per misurazione EEG.

La forma d'onda EEG permette di valutare l'attività elettrica cerebrale, alla quale contribuiscono tutti i tipi di neuroni, ma dove i singoli contributi dipendono dalla loro forma e localizzazione. La capacità di sincronizzazione, la prossimità rispetto allo scalpo e i peculiari dendriti lunghi e sottili in grado di generare forti dipoli lungo gli assi somato-dendritici, fanno dei neuroni piramidali i principali attori del segnale elettroencefalografico [5].

Considerando che il segnale subisce una attenuazione e distorsione nell'attraversamento dei tessuti molli e duri tra la sorgente e l'elettrodo, e che quest'ultimo fornisce informazioni circa l'attività di una massa cellulare contenente tra i cento milioni ed il miliardo di neuroni, i dati ottenuti dalla misura extracranica sono soggetti a forte rumore, causato dalla dispersione di corrente nel volume conduttore della testa. Questo determina la perdita di risoluzione spaziale, che rende necessari algoritmi di deblurring per l'applicazione dell'EEG in procedure di mapping, e una intensità assai più debole in confronto ad altri segnali bioelettrici [6].

L'interfaccia elettrodo – scalpo rappresenta dunque un punto critico per l'acquisizione del segnale EEG.

Questo ha pertanto portato allo sviluppo di varie tipologie di elettrodi classificabili in base alla necessità o meno di porre gel elettrolitico all'interfaccia metallo – cute,

per la riduzione dell'impedenza di quest'ultima (elettrodi wet – dry), oppure in base alla presenza di appositi circuiti preamplificatori (elettrodi attivi – passivi).

L'apposizione degli elettrodi sullo scalpo avviene seguendo degli standard di posizionamento, tra i quali il più utilizzato è il Sistema Internazionale 10-20. Questa metodica è stata sviluppata per standardizzare la riproducibilità, e si basa sulla corrispondenza tra la posizione dell'elettrodo e l'area della corteccia cerebrale sottostante. 10-20 fa riferimento alla distanza tra elettrodi adiacenti, che corrisponde al 10% o al 20% della lunghezza di assi ortogonali del cranio, individuati da quattro punti di reperi anatomici:

- Nasion: distinta depressione tra gli occhi, appena sopra il ponte nasale.
- Inion: sommità della protuberanza occipitale esterna dell'osso occipitale.
- Punti preauricolari.

Ogni sito è identificato da una lettera, in riferimento al lobo, e da un numero, che indica l'emisfero. Le lettere F, T, C, P ed O distinguono rispettivamente i lobi frontale, temporale, centrale (scopo esclusivamente funzionale, non esiste lobo centrale), parietale ed occipitale. In aggiunta le lettere A e Fp individuano i lobi auricolari e la regione frontopolare. Numeri pari sono associati agli elettrodi dell'emisfero destro, mentre numeri dispari a quelli dell'emisfero sinistro; 'z' (zero) si riferisce agli elettrodi sulla linea mediana.

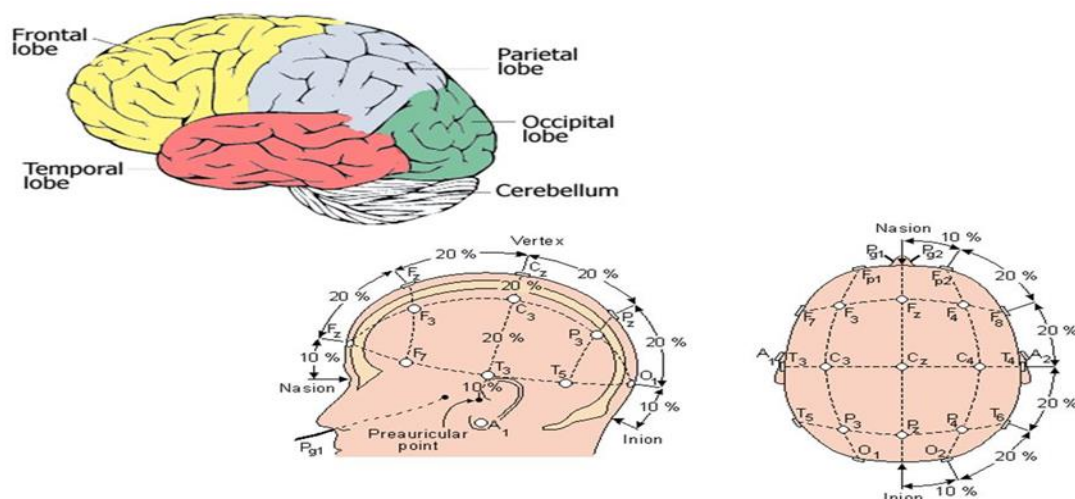


Figura 4: Sistema Internazionale 10 - 20.

Il segnale EEG, che è descritto da oscillazioni tra i 0.5 e i 100 Hz, e da ampiezze di decine di μV , è costituito da diverse componenti discriminabili in base alle diverse frequenze da cui esse sono caratterizzate, i cosiddetti ritmi cerebrali.

- **Delta** (δ): 0.5 – 4 Hz. Caratterizza stadi di sonno profondi, anche detti ad onde lente; non sono presenti in stato di veglia in condizioni fisiologiche.



- **Theta** (θ): 4 – 8 Hz. Associato a stadi di sonno e rilassamento.



- **Alfa** (α): 8 – 13 Hz. Caratteristico di condizioni di veglia ma di riposo mentale; registrato soprattutto nelle aree occipitali e parietali quando il soggetto è ad occhi chiusi.



- **Beta** (β): 13 – 30 Hz. Dominante in soggetti ad occhi aperti nel mentre di qualche attività.



- **Gamma** (γ): > 30 Hz. Presente in stati di profonda concentrazione.



2. Dispositivo di acquisizione: OpenBCI

OpenBCI è un sistema open source di acquisizione, trasmissione e archiviazione di biopotenziali, segnali elettrici generati da cellule del tessuto nervoso e muscolare, che consentono di valutare l'attività elettrica cerebrale (elettroencefalografia, EEG), l'attività elettrica cardiaca (elettrocardiografia, ECG) e l'attività elettrica muscolare (elettromiografia, EMG).

L'acquisizione avviene mediante otto canali differenziali (INxP – INxN) ad alto guadagno e basso rumore, i cui pin sono compatibili con gli elettrodi standard utilizzati per l'elettroencefalografia, sia attivi che passivi. Il segnale analogico registrato viene digitalizzato prima della trasmissione radio attraverso un circuito integrato ADS1299 sviluppato dalla Texas Instrument e appositamente progettato per applicazioni biomedicali come appunto la misura di EEG e di biopotenziali. Esso consiste in un convertitore analogico digitale ad otto canali con campionamento simultaneo delta-sigma ($\Delta\Sigma$) a basso rumore e guadagno programmabile x1, x2, x4, x6, x8, x12, x24, con una risoluzione pari a 24 bit e frequenza di campionamento che copre un range tra i 250 sps e i 16 ksp.

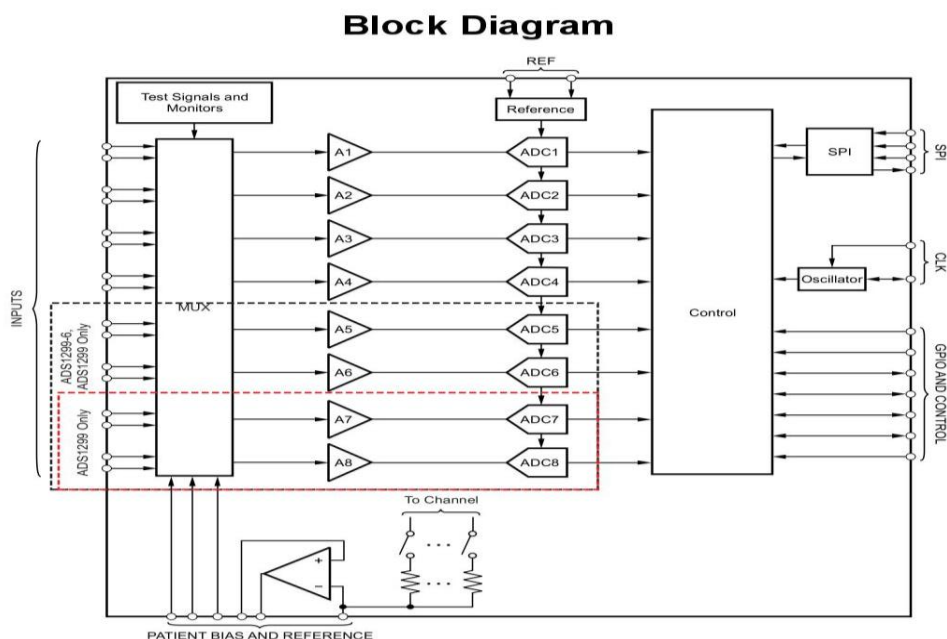


Figura 5: diagramma a blocchi della Cyton board.

I biopotenziali misurati nell'elettroencefalografia sono piccoli se comparati ad altri segnali biologici come l'EMG (50 μV – 5 mV) e l'ECG (0.5 – 5 mV), contando su un set di ampiezze tra i 2 ed i 100 μV . Ciò nonostante l'ADS1299 è in grado di rilevare al meglio questo tipo di segnale grazie al bassissimo rumore d'ingresso introdotto dal suo PGA (Programmable Gain Amplifier) interno ad

elevate prestazioni, che per particolari condizioni (frequenza di campionamento – guadagno – temperatura) è inferiore al microvolt.

Ogni canale è ottimizzato per rilevare una singola forma d'onda EEG, mentre le connessioni interne dipendono dalla modalità d'acquisizione con cui il segnale viene misurato.

Le modalità sequenziale e referenziale sono possibili montaggi con cui l'ADS1299 può essere configurato in tipici set up per la misura di EEG.

La sequenziale consente di valutare la differenza di potenziale tra due elettrodi adiacenti $INxP - INxN$, il che rende necessari $2n$ elettrodi per poter ottenere n segnali utili.

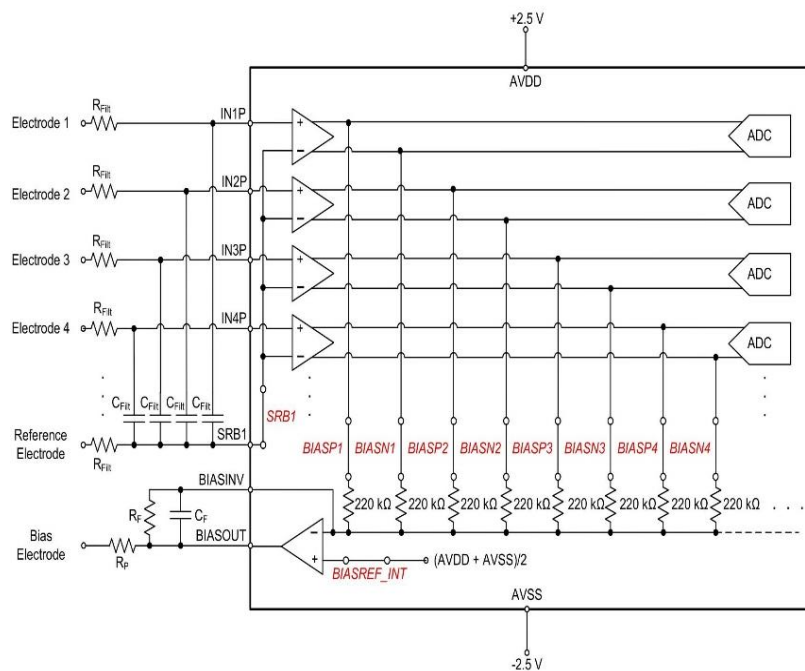


Figura 6: configurazione elettrica montaggio sequenziale.

Nella referenziale ogni forma d'onda EEG consiste nella differenza di potenziale valutata tra la tensione dei singoli elettrodi ed un elettrodo comune di riferimento. Questo è possibile grazie ai pin SRB1 e SRB2. Quando l'elettrodo di riferimento è connesso al pin SRB1 e tutti gli altri elettrodi ai rispettivi canali positivi $INxP$, è attivata la modalità referenziale. Del tutto analogo è l'impiego del pin SRB2, che sarà al contrario l'elettrodo di riferimento per i canali negativi $INxN$. Per questa configurazione, n segnali utili sono ottenuti mediante l'impiego di $n+1$ elettrodi.

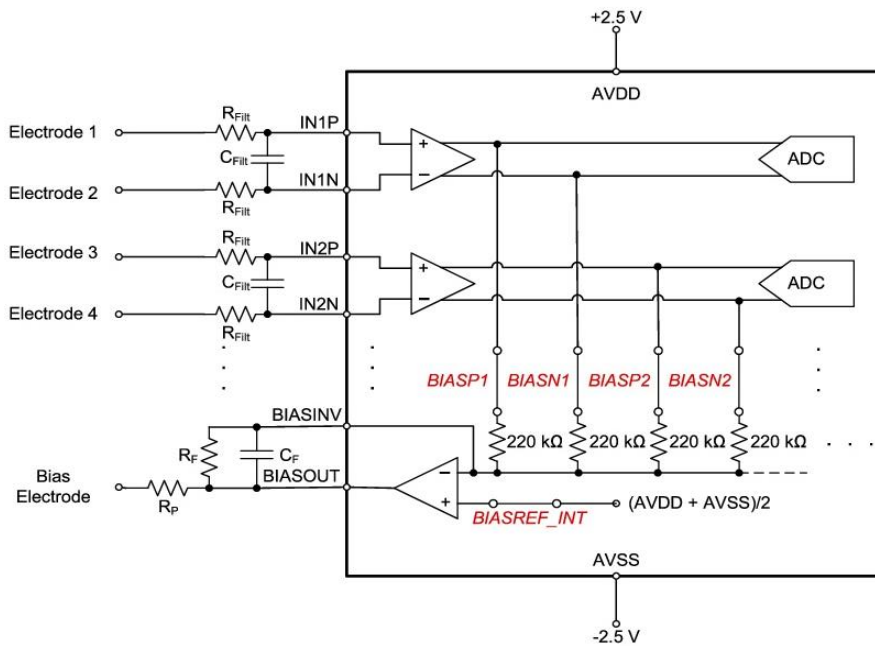


Figura 7: configurazione elettrica montaggio referenziale.

In entrambi i montaggi il segnale di basso livello in ingresso al PGA subisce un filtraggio passa-basso, effettuato per mezzo delle componenti passive R_{filt} e C_{filt} , il cui dimensionamento è vincolato a standard tecnici per l'elettronica medica e dalla frequenza di taglio introdotta dal filtro. L'amplificatore di bias può essere configurato in modo tale da cancellare il segnale indesiderato di modo comune a cui sono soggetti gli elettrodi, tramite un feedback negativo che viene realizzato collegando un elettrodo al pin BIASIN, il quale sarà in seguito connesso al paziente. Le varie funzionalità della board, comprese le attività ed i parametri modificabili dell'ADS1299, così come l'interfacciamento host, sono gestite da un microcontrollore a 32 bit della famiglia PIC Microchip, il PIC32MX250FI28B. Il segnale campionato e digitalizzato viene dunque memorizzato su una scheda micro SD inseribile in un apposito slot, oppure inviato ad un dispositivo esterno tramite un sistema radio RFduino a connessione Bluetooth. Un accelerometro LIS3DH a 3 assi rende disponibili dati relativi all'accelerazione in un sistema cartesiano ortonormale definito graficamente accanto alla componente in questione, direttamente sulla board. OpenBCI mette inoltre a disposizione otto ulteriori canali di acquisizione, per un totale di sedici, tramite il collegamento mediante appositi pin di un modulo Daisy, appositamente progettato come espansione della Cyton board. Il modulo Daisy viene alimentato per mezzo dei pin con cui è connesso alla board, e sfrutta lo stesso meccanismo d'acquisizione di cui sopra, avendo a disposizione un proprio circuito integrato ADS1299.

Il sistema complessivo Cyton board + modulo Daisy viene alimentato con sole batterie da 3 – 6 V.

Viene fornita un'apposita scatoletta con collegamento maschio a 2 pin per l'inserimento in serie di quattro stilo AA da 1.5 V l'una. La board presenta uno switch a 3 posizioni, che ne consentono lo spegnimento (OFF), l'accensione e l'abilitazione allo svolgimento delle sue funzionalità (PC), ed una che ne consente l'accensione ma non la possibilità di acquisizione e trasmissione (BLE). Il trasferimento dei dati verso un dispositivo esterno rende necessario l'impiego della OpenBCI USB dongle, anch'essa equipaggiata con un sistema Bluetooth RFduino ed alimentata via USB. La dongle presenta uno switch a due posizioni, delle quali GPIO6 abilita il trasferimento dati, mentre RESET consente la riprogrammazione del sistema radio.

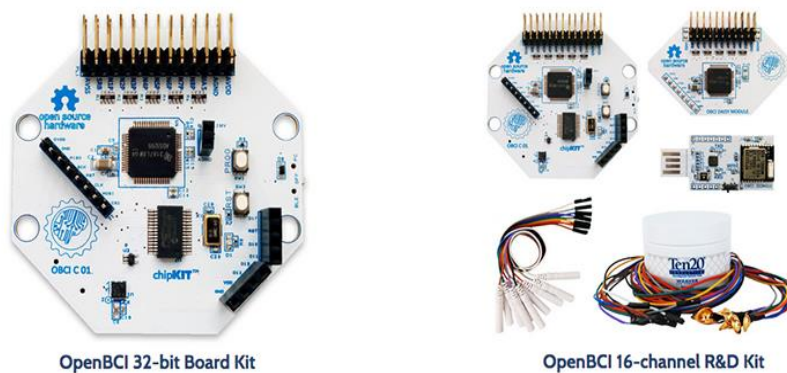


Figura 8: OpenBCI Cyton board, Daisy module, USB dongle.

OpenBCI può sfruttare varie componenti software per la gestione della board e per la visualizzazione real time dei segnali bioelettrici e dei dati provenienti dall'accelerometro, tra cui OpenVibe, Neuromore, ed anche un'applicazione opensource sviluppata in linguaggio Processing appositamente realizzata per questo tipo di hardware, OpenBCI GUI. La schermata principale che si apre all'avvio del software, consente di procedere verso l'acquisizione dei dati, attraverso il pulsante 'Live from Cyton'. Nella nuova finestra che si apre in seguito, è possibile selezionare la porta in cui la dongle è inserita, per comunicare all'applicativo da quale COM è attesa la ricezione dei dati. È possibile verificare lo stato del sistema attraverso il pulsante 'Status': la scritta 'Success: System is up' comparirà se la procedura di connessione ha avuto successo, viceversa, in caso sia sorto un qualche tipo di problema nella fase di connessione, comparirà la scritta 'Failure: System is down'. In questo ultimo caso è opportuno verificare l'effettiva accensione della board, il corretto collegamento della dongle, o effettuare l'autoscan. Se la procedura di connessione ha avuto successo, il sistema è finalmente abilitato alla trasmissione e ricezione dei dati. È possibile, a questo punto, selezionare il numero di canali di acquisizione (otto se si è in possesso della sola board, sedici se si è in possesso dell'espansione modulo Daisy), ed immettere il nome con cui il file verrà salvato, che di default è 'OpenBCI-RAW- + data/ora'. Il pulsante 'START SYSTEM' porta a termine la procedura di collegamento tra l'hardware e il software GUI.

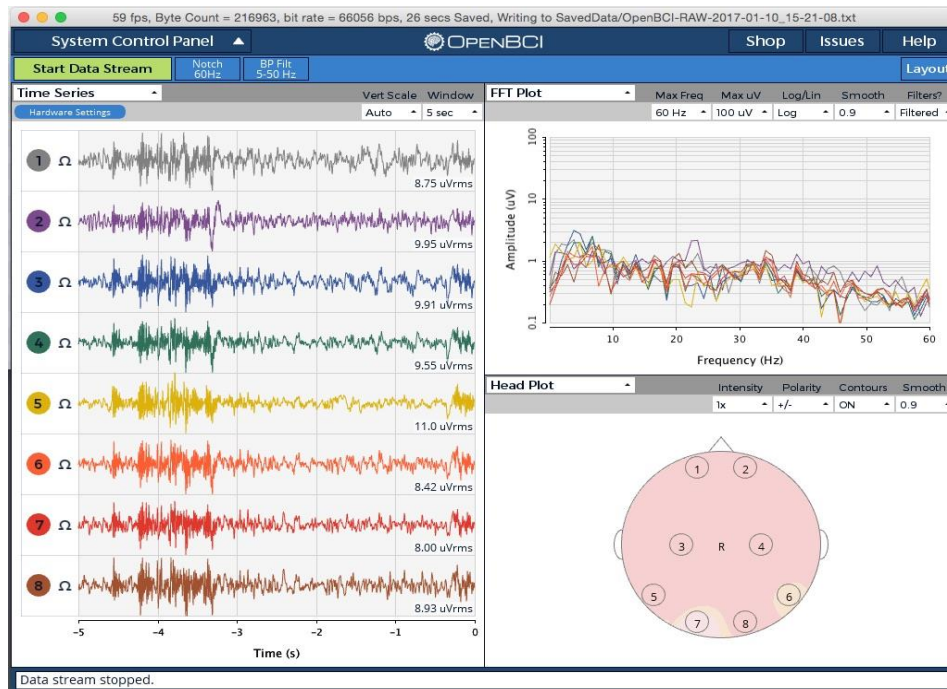


Figura 9: pannello di streaming dei dati.

La nuova schermata che si apre è divisa in tre sotto finestre principali, in ognuna delle quali è possibile selezionare il tipo di segnale che vuole essere visualizzato; tra le scelte possibili sono presenti le “time series”, la FFT del segnale in ingresso, l’accelerometro e lo scalp plot. Nelle “time series” vengono riportati gli otto o i sedici canali in cui potranno essere visualizzati singolarmente i segnali EEG e per ognuno dei quali è possibile modificare il guadagno del PGA, includere o meno la retroazione negativa dell’amplificatore di bias e selezionare il pin (SRB1 o SRB2) a cui è collegato l’elettrodo di riferimento in caso di configurazione referenziale. Sono impostabili inoltre un fattore di scala per il modulo del segnale e la lunghezza della finestra temporale di visualizzazione. La FFT consiste in un unico grafico, di cui è possibile modificare il set di frequenze in ascissa ed il fattore di scala delle ampiezze in ordinata, in cui vengono contemporaneamente riportate le trasformate di Fourier dei segnali EEG, distinguibili mediante colori differenti associati a quelli delle “time series”. I dati dell’accelerometro sono visualizzabili attraverso tre canali in cui viene riportata la variazione nel tempo dell’accelerazione lungo i tre assi cartesiani definiti dallo stesso accelerometro. Nello scalp plot è infine verificabile l’attivazione più o meno forte delle varie aree cerebrali attraverso una corrispondenza fissa e non modificabile elettrodo - #canale – corteccia. I segnali possono subire un filtraggio esclusivamente software di tipo passa basso e di tipo notch a 50-60 Hz per eliminare il disturbo di rete.

Dal momento in cui parte lo streaming dei dati (“Start data stream”), questi cominciano ad essere memorizzati in un file .txt all’interno della cartella “SavedData” dell’applicativo GUI, con il nome scelto precedentemente. Questo file è organizzato in ventuno colonne.

La prima colonna consiste in un indice adibito al solo conteggio, che si incrementa riga per riga fino ad un massimo di 255, per poi azzerarsi e ricominciare. Le colonne da 2 a 17 riportano i valori campionati dei segnali EEG in ingresso, senza alcun tipo di filtraggio. Utilizzando i soli primi otto canali, il file riserva comunque sedici colonne, delle quali le ultime otto assumono valori nulli. Nelle colonne da 18 a 20 vengono inseriti i dati dell’accelerometro, che con intervalli più o meno regolari sono sostituiti da valori AUX, che se non sfruttati assumono anch’essi valore nullo. Nella colonna 21 sono riportate data ed ora alle quali il dato è stato campionato.

Il trasferimento dei dati dalla board al dispositivo in cui il software è in run, che avviene mediante le componenti radio RFduino presenti sulla dongle e sulla stessa board, consiste nell’invio di pacchetti da 32 byte, i quali contengono un header seguito da un contatore ad 8 bit, seguito dai dati degli otto canali e dei tre assi dell’accelerometro, quest’ultimi intervallati con dati AUX, per concludersi con le informazioni riguardanti data ed ora.

Fattori che giocano un ruolo determinante nel modificarsi di questa procedura sono l’utilizzo di frequenze di campionamento più elevate e l’impiego di sedici canali anziché otto. La frequenza di campionamento è impostata di default a 250 Hz, poiché frequenze maggiori sono compatibili con l’ADS1299 ma potrebbero non esserlo con i limiti seriali e di collegamento wireless di RFduino. Il sistema a sedici canali prevede sempre un campionamento a 250 Hz, ma, poiché anche qui i limiti imposti dal collegamento radio limitano il numero di byte trasferibili per pacchetto a 32, si alternano i pacchetti di campionamento provenienti dalla board e dal modulo Daisy; un numero dispari del contatore è associato all’invio dei dati dalla board, viceversa un numero pari del contatore è associato all’invio dei dati dal modulo Daisy. Per limitare questa perdita di informazione, è previsto un algoritmo di averaging prima dell’invio al sistema radio, il cui funzionamento è indicato nella seguente tabella.

# Sample	Recorded	Sent	Sent
0	Board(0), Daisy(0)		Invalid sample
1	Board(1), Daisy(1)	Avg(Board(0),Board(1))	
2	Board(2), Daisy(2)		Avg(Daisy(1),Daisy(2))
3	Board(3), Daisy(3)	Avg(Board(2),Board(3))	
4	Board(4), Daisy(4)		Avg(Daisy(3),Daisy(4))
5	Board(5), Daisy(5)	Avg(Board(4),Board(5))	
6	Board(6), Daisy(6)		Avg(Daisy(5),Daisy(6))

In entrambi i casi, di più alte frequenze di campionamento e numero di canali, è possibile implementare algoritmi di compressione od utilizzare i byte AUX per permettere trasferimenti corretti di dati senza perdita di informazione, evitando anche gli algoritmi di averaging.

3. Sessione sperimentale

3.1 Esperimenti

L'esperimento è suddiviso in due sessioni sperimentali (EX1, EX2) realizzate all'interno dello stesso ambiente consecutivamente. In entrambe le sessioni è stato misurato il segnale EEG per valutare variazioni nell'attività della corteccia durante l'immersione.

Tutti i soggetti hanno indossato il solo costume da bagno per tutta la durata dell'esperimento.

In ogni sessione il segnale EEG viene misurato per un arco temporale di 12 minuti, nel quale il soggetto, ad intervalli regolari di 2 minuti, mantiene gli occhi aperti o chiusi in alternanza, per un totale di tre registrazioni con occhi aperti e tre con occhi chiusi. Per poter discriminare le varie registrazioni in fase di elaborazione, è stato dato un leggero colpo all'accelerometro ogni qualvolta la condizione occhi aperti/chiusi fosse cambiata (quindi ogni 2 minuti).

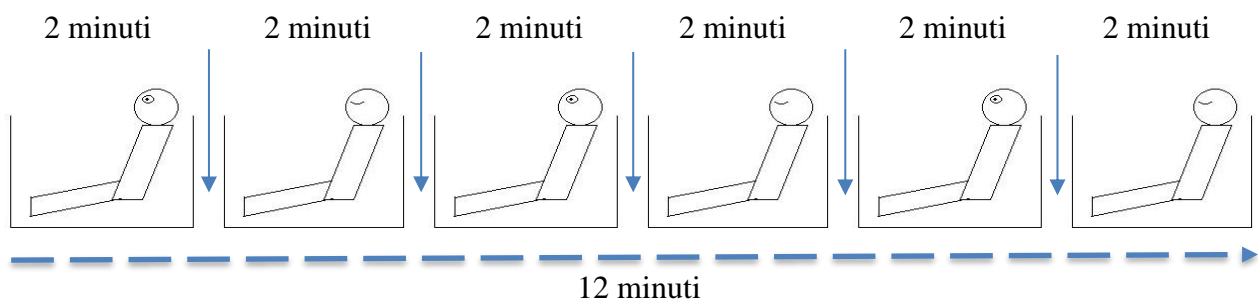


Figura 10: EX1

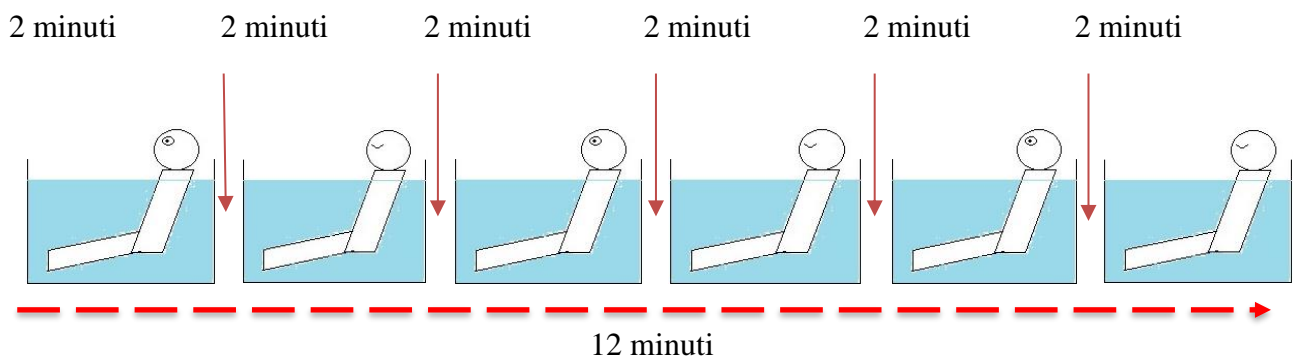


Figura 11: EX2

EX1 consiste in una registrazione a secco, trattata come condizione di baseline. Il soggetto è seduto su uno step, con schiena appoggiata al muro, collo e braccia rilassati, gambe distese. In EX2 il soggetto è seduto su uno step posto a fondo piscina, schiena appoggiata al bordo di quest'ultima, collo e braccia rilassati, gambe distese. L'acqua arriva ad immergere ogni soggetto all'altezza delle spalle. EX1 ed EX2 sono stati eseguiti in ordine casuale per evitare effetti di carry-over.

La temperatura dell'acqua della piscina, non soggetta al nostro controllo, è stata di circa 31.3 °C per tutti le sessioni sperimentali.

3.2 Soggetti

Le registrazioni dei tracciati EEG sono state ottenute da quattro soggetti maschi sani e volontari, con età compresa tra i 22 ed i 41 anni (età media: 27.25 ± 9.215 anni). Tutti i quattro soggetti sono destrimani, nessuno ha storia clinica di malattie neurologiche o psichiatriche, e nessuno fa uso di medicinali.

3.3 Registrazione EEG

È stata utilizzata una cuffia per l'elettroencefalografia standardizzata secondo il Sistema Internazionale 10 – 20. Il posizionamento dei sedici elettrodi a nostra disposizione (dovuto al numero limitato di canali d'acquisizione del dispositivo BCI) è stato pensato in modo tale da coprire nel migliore dei modi le aree corticali di nostro interesse, quali la corteccia somato sensoriale primaria (S1), parietale associativa (PAA), motoria supplementare (SMA) e motoria primaria (M1). Risulta infatti, secondo uno studio che utilizza l'indagine fNIRS, che l'apporto di ossigeno in tali aree durante l'immersione in acqua aumenti significativamente, il che comporta un aumento della loro attività. Gli elettrodi sono stati disposti nei siti FCz, FC1, FC3, FC2, FC4, Cz, C1, C3, C2, C4, CPz, CP1, CP3, CP2, CP4, Pz, come anche illustrato nella seguente figura.

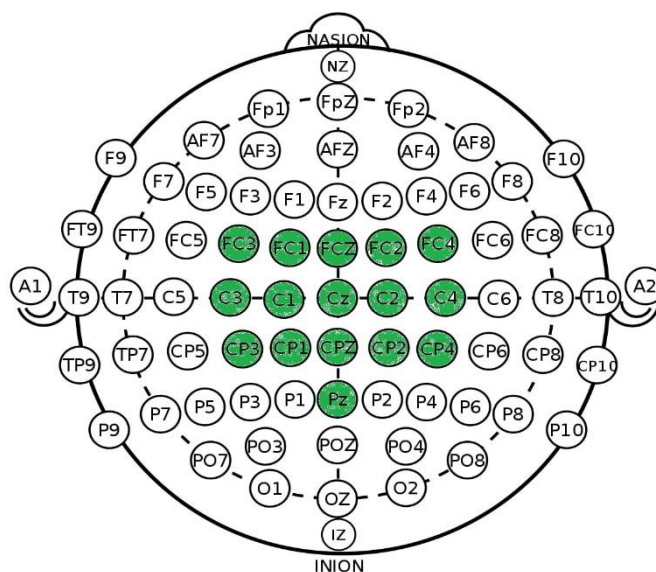


Figura 12: in verde i siti in cui gli elettrodi sono disposti.

Il set up utilizzato per la misura EEG prevede un montaggio referenziale. L'elettrodo di riferimento per i sedici elettrodi è stato posto nel lobo auricolare destro, mentre l'elettrodo di bias adibito alla retroazione negativa per l'eliminazione del rumore di modo comune nel lobo auricolare sinistro.

La frequenza di campionamento utilizzata è stata quella impostata di default nel dispositivo d'acquisizione, pari a 250 Hz. Frequenze maggiori sarebbero state compatibili con il convertitore analogico – digitale ADS1299 dell'OpenBCI, ma non con i limiti di trasmissione seriale e del sistema radio RFDuino.

Sono stati utilizzati elettrodi 'wet' passivi. Prima di ogni registrazione, è stato posto del gel elettrolitico all'interfaccia metallo - cute per diminuire l'impedenza di quest'ultima, che tuttavia non è stato possibile quantificare con la tecnologia a nostra disposizione. Si assume pertanto che ognuna delle prove sia caratterizzata da impedenze differenti.



Figura 13: fase di registrazione EX2.

3.4 Dispositivo BCI

La Cyton board è stata posta nel retro della cuffia, a cavallo dei siti O1 e O2, e vincolata ad essa con dei laccetti. Poiché il sistema di alimentazione a pile fornito con il dispositivo rappresentava un problema in termini di ingombro, risultando dunque difficile il suo posizionamento, è stato sostituito con una batteria ricaricabile al litio da 3.7 V e consumo 450 mAh. Ad essa è stata saldato un modulo caricabatterie litio con presa microUSB, secondo le modalità illustrate in figura.

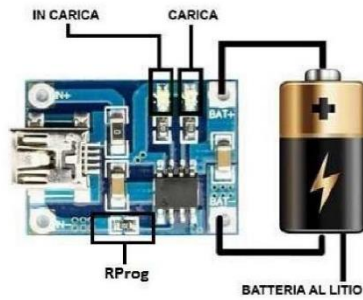


Figura 14: collegamento batteria Li-Po - caricabatterie.

Il modulo per la ricarica è basato sul chip TP4056, caricabatterie che sfrutta un metodo lineare a corrente costante per singola cella al litio e ideale per applicazioni portatili. La carica avviene ad una corrente di 1 A (modificabile con sostituzione di resistenza), con tensione di fine carica fissata a 4.2 V. Due led indicano lo stato di ricarica della batteria (rosso: in carica, blu: ricarica completata).



Figura 15: batteria Li-Po 3.7 V 450 mAh (sinistra), modulo caricabatterie litio con presa microUSB (destra).

Durante il funzionamento del dispositivo BCI, il caricabatterie funge da bypass verso la board.

4. Elaborazione dei dati

I dati registrati dal dispositivo BCI in fase d'acquisizione sono stati salvati come file .txt, i quali sono organizzati in ventuno colonne. La prima colonna consiste in un indice adibito al solo conteggio, che si incrementa riga per riga fino ad un massimo di 255, per poi azzerarsi e ricominciare. Le colonne da 2 a 17 riportano i valori campionati dei segnali EEG in ingresso, senza alcun tipo di filtraggio. Nelle colonne da 18 a 20 vengono inseriti i dati dell'accelerometro, che con intervalli più o meno regolari sono sostituiti da valori AUX. Se non utilizzati, come nel nostro caso, assumono valori nulli. Nella colonna 21 sono riportate data ed ora alle quali il dato è stato campionato.

L'intera mole di dati verrà trattata con l'impiego dell'ambiente di calcolo MATLAB. Schematicamente l'intera elaborazione può essere riassunta mediante uno schema a tre blocchi:

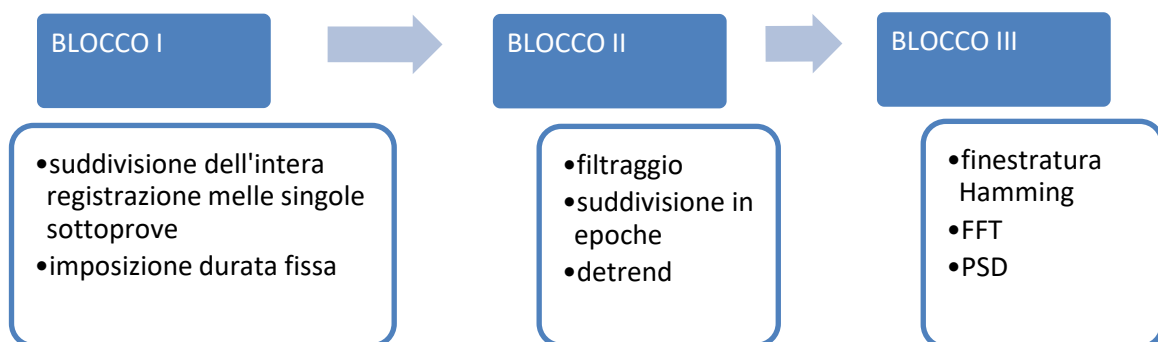


Figura 16: schema a blocchi dell'elaborazione del segnale EEG.

Ogni blocco ha una funzionalità specifica:

- BLOCCO I: preparazione delle prove all'analisi nel dominio del tempo e delle frequenze.
- BLOCCO II: analisi nel dominio del tempo.
- BLOCCO III: analisi nel dominio delle frequenze.

Attraverso un'analisi nel dominio delle frequenze dei segnali campionati, è stato osservato se e come la condizione di immersione in acqua avesse modificato l'attività cerebrale delle aree corticali sotto indagine, rispetto alla condizione a secco. Questo è stato possibile attraverso il calcolo della potenza spettrale nelle bande theta, alfa, beta 1, beta2 e beta3 per i singoli elettrodi, e confrontando successivamente con un'analisi statistica i risultati ottenuti nelle due condizioni.

4.1 BLOCCO I

Il primo passo verso quella che sarà la vera e propria elaborazione del segnale EEG registrato negli esperimenti effettuati, è la scissione dell'intera registrazione (12 minuti nella condizione di baseline a secco, 12 minuti nella condizione di immersione in acqua) nelle dodici prove descritte nel paragrafo Sessione sperimentale.

Il fatto che i dati dell'accelerometro siano sostituiti sistematicamente da valori AUX nulli, pone una prima difficoltà per la loro semplice visualizzazione, senza la quale non si può procedere verso la suddivisione. Siamo pertanto ricorsi alla funzione MATLAB "find", la quale permette di salvare in un vettore gli indici dei valori non nulli di una variabile che le viene data in ingresso. Plottando i dati dell'accelerometro in corrispondenza degli indici trovati, si ottiene un grafico nel quale sono apprezzabili i picchi in corrispondenza della variazione occhi aperti/chiusi.

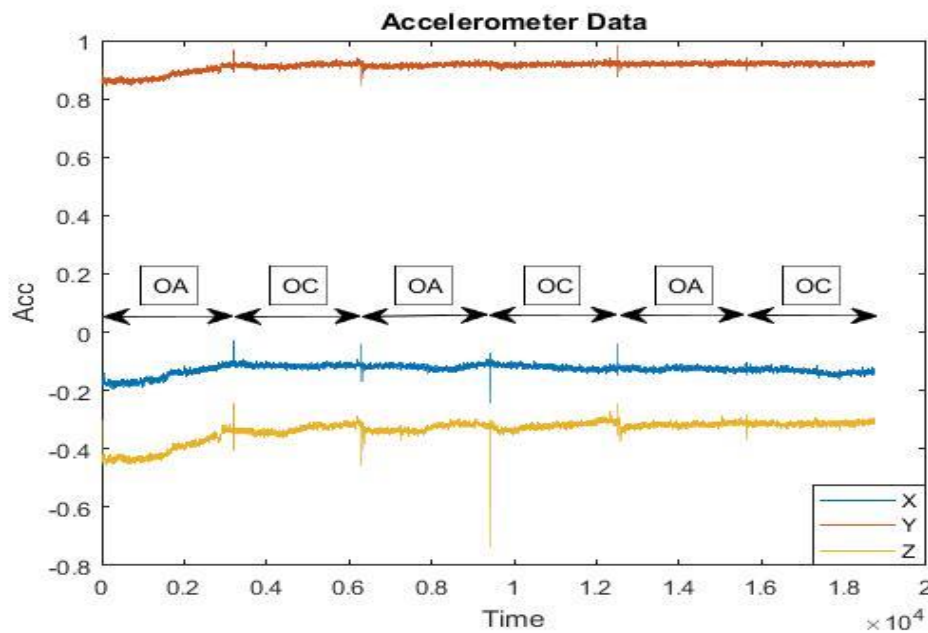


Figura 17: valori dell'accelerazione lungo i tre assi di un sistema ortonormale cartesiano (X: blu, Y: rosso, Z: giallo).

Iterando i dati alla ricerca del valore dell'accelerazione assunta nel picco, siamo in grado di localizzare il corrispondente indice d'ascissa che delimita due prove consecutive.

I dati vengono dunque salvati in dodici prove, con la seguente modalità:

- $Sn_dry/WI_open_1 = data(1 : k, 2 : 17);$
- $Sn_dry/WI_close_1 = data(k+1 : w, 2 : 17);$
- ...
- $Sn_dry/WI_close_3 = data(j+1 : end, 2 : 17);$

dove k, w, \dots, j sono gli indici trovati precedentemente, ed n il numero del soggetto.

In totale, le prove ottenute sono dunque dodici, sei nella condizione a secco, e sei nella condizione di immersione; per ogni condizione ambientale sono presenti tre prove ad occhi aperti e tre ad occhi chiusi.

È stata stabilita una durata fissa e pari a 110 s, escludendo i primi 4 s di ognuna di esse, in modo tale da permettere una stabilizzazione del segnale EEG dopo l'inizio dell'esperimento e ogni qualvolta fosse cambiata la condizione occhi aperti/chiusi.

Le singole prove, la cui durata è stata resa uniforme, vengono salvate in modo analogo al precedente:

- $Sn_dry/WI_open_1_x;$
- $Sn_dry/WI_close_1_x;$
- ...
- $Sn_dry/WI_close_3_x;$

4.2 BLOCCO II

Il segnale è stato filtrato con un filtro passa-basso Butterworth del quarto ordine, con frequenza di taglio fissata a 45 Hz. È stato preferito evitare un filtro passa-banda per l'eliminazione della componente continua, dato l'effetto di attenuazione che avrebbe avuto su componenti spettrali a basse frequenze utili alla nostra analisi. Anche l'ordine del filtro è stato mantenuto relativamente basso, in quanto ordini maggiori sono più facilmente predisposti all'instabilità.

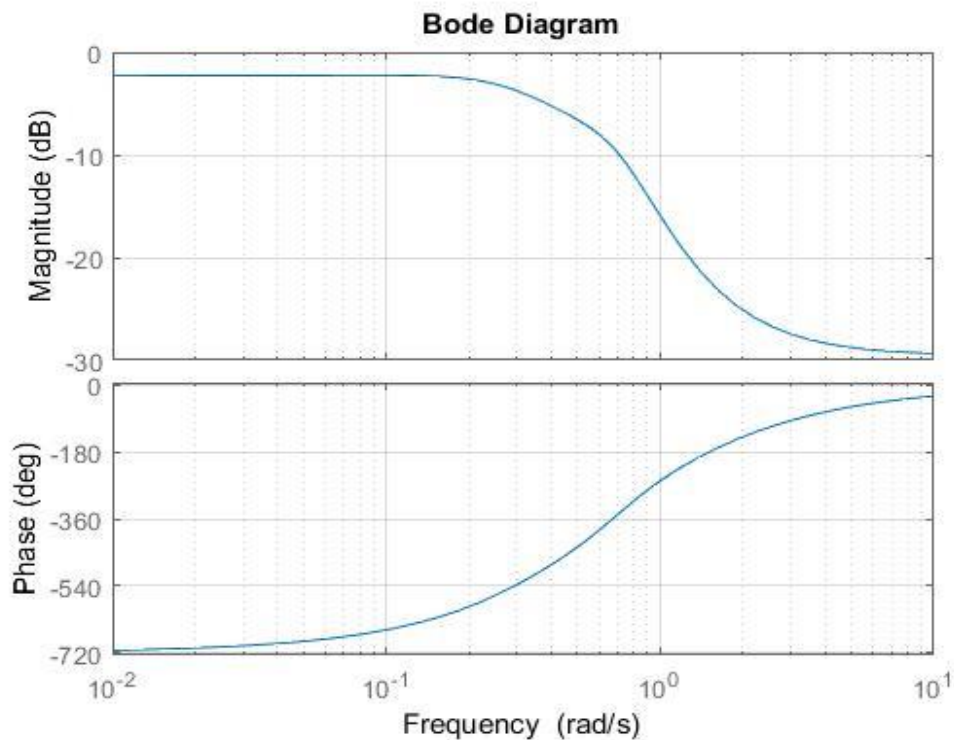


Figura 18: diagrammi di Bode del LPF.

Il filtro è stato applicato alle singole prove tramite la funzione MATLAB “filtfilt”, che realizza un filtraggio digitale senza sfasamento, processando i dati in entrambe le direzioni, da sinistra verso destra e viceversa. Quello che si ottiene, come già detto, è uno sfasamento nullo del segnale in ingresso. Inoltre, si ottiene una funzione di trasferimento il cui modulo è il quadrato di quella originale, ed un ordine del filtro doppio rispetto a quello definito dai coefficienti ottenuti dalla funzione “butter” con cui il filtro digitale è stato creato.

Per il tipo di elaborazione che si vuole effettuare è necessario che il segnale sia stazionario. Dato che il segnale EEG non possiede questa caratteristica, si procede alla sua suddivisione in piccoli intervalli temporali in cui esso può essere assunto tale. Questi intervalli prendono il nome di epoche. È stata stabilita una durata di due secondi per ogni epoca; data la frequenza di campionamento fissata a 250 Hz, l’analisi verrà ogni volta effettuata su record di 500 campioni.

Il segnale EEG, su cui è stato eseguito un filtraggio esclusivamente passa-basso, è affetto da un trend lineare e da un offset dovuto alla componente continua, che non ne permettono una corretta visualizzazione nel dominio dei tempi. Ogni epoca subisce dunque un “detrend”, che rimuove sia il valore medio sia il trend lineare, senza alterare o attenuare le armoniche del segnale.

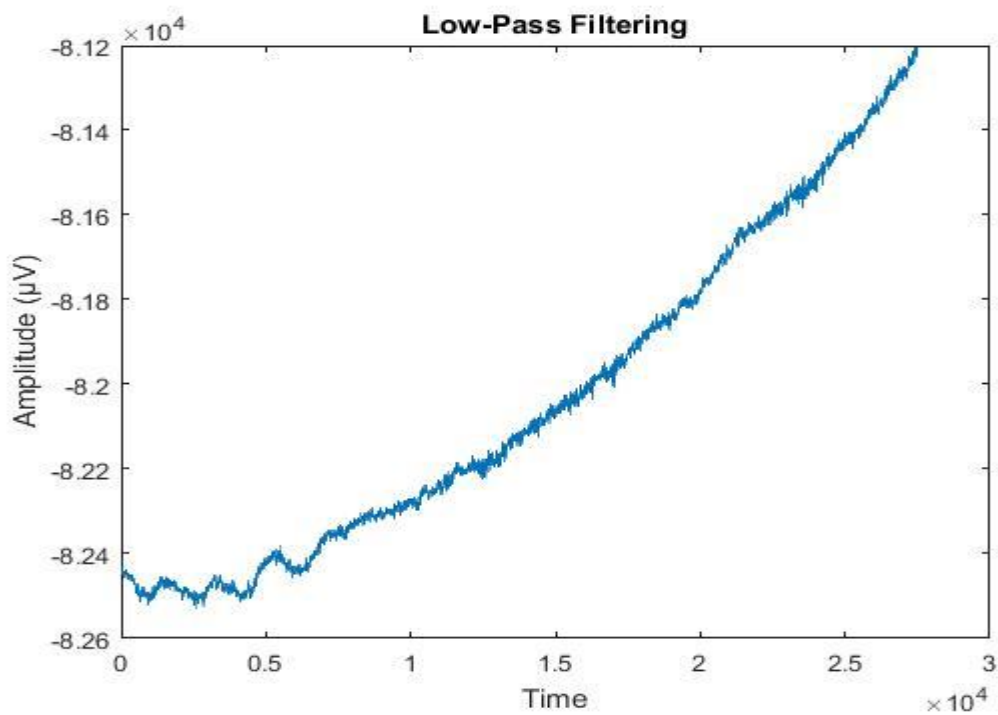


Figura 19: segnale nel tempo con il solo filtraggio passa-basso.

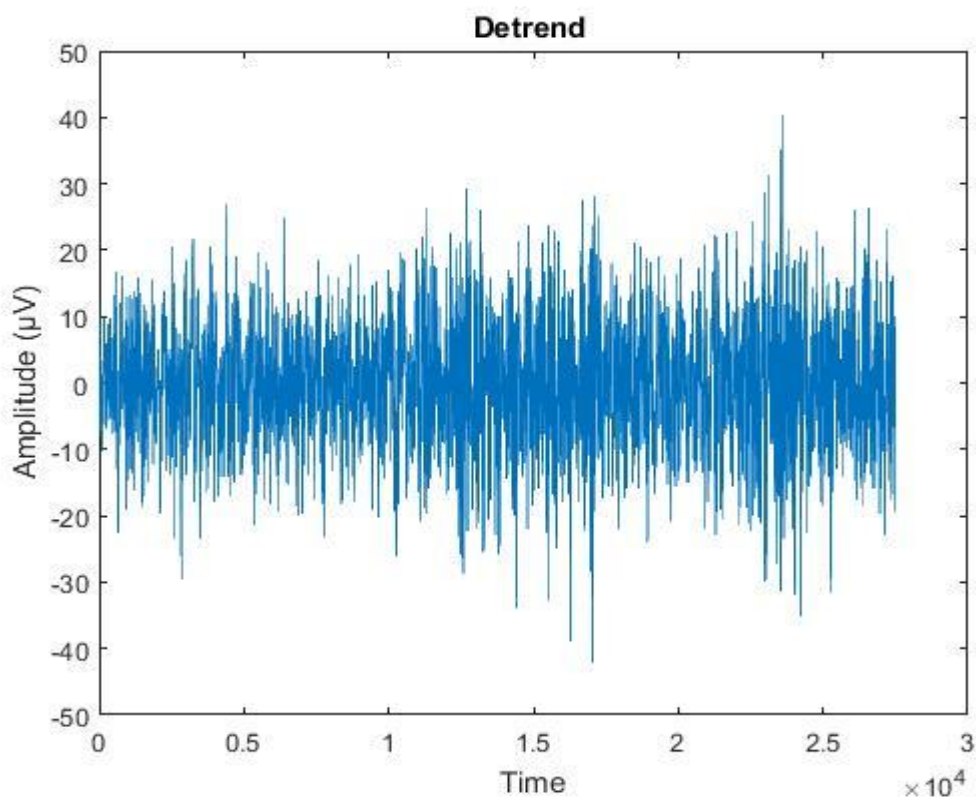


Figura 20: segnale nel tempo con rimozione di offset e trend lineare.

Questa prima fase di elaborazione predispone dunque il segnale EEG ad una analisi in frequenza.

4.3 BLOCCO III

L'epoca o finestra di visualizzazione sulla quale viene effettuata l'analisi di Fourier, contiene un numero di campioni che non costituisce un numero intero di periodi (il segnale EEG non è periodico). L'analisi in frequenza eseguita su questo tipo di campionamento, detto non coerente, fornisce dei risultati errati. I problemi maggiori si riscontrano principalmente agli estremi dell'intervallo di visualizzazione per effetto di discontinuità dovute alla frammentazione, mentre nella parte centrale viene riprodotto fedelmente il segnale originale. In questi casi si ricorre a delle particolari funzioni di finestratura o di smoothing. Queste finestre pesano differenzialmente i campioni, assumendo valori alti nella parte centrale dell'intervallo di visualizzazione, bassi o nulli agli estremi, in modo tale da rendere trascurabili gli effetti di questi ultimi e concentrare l'analisi nella porzione centrale, per ottenere uno spettro più accurato.

Nel caso in esame è stata utilizzata una finestra di Hamming a 500 campioni, la quale è stata poi moltiplicata ai segnali delle singole epoche prima dell'analisi nel dominio delle frequenze.

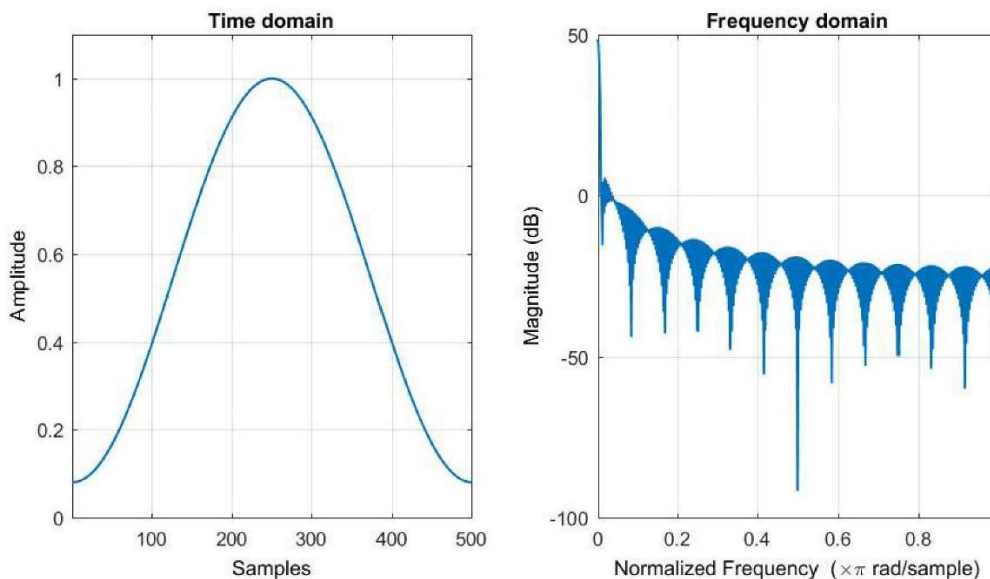


Figura 21: finestra di Hamming a 500 campioni

La trasformata di Fourier è un'operazione matematica che permette di analizzare un segnale dipendente dal tempo nel dominio delle frequenze. Essa scompone tale generico segnale in una somma infinita di sinusoidi con frequenza, ampiezza e fase differenti. Essa viene definita sia per segnali tempo continui, dove assume la formulazione:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{-j2\pi ft} dt$$

sia per segnali tempo discreti, dove invece è definita come:

$$X(z) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x(n)e^{-j2\pi fn}$$

Nel caso in esame, l'analisi di Fourier viene effettuata su singole epoche di 500 campioni. Quello che si ottiene è uno spettro delle ampiezze del genere riportato in figura:

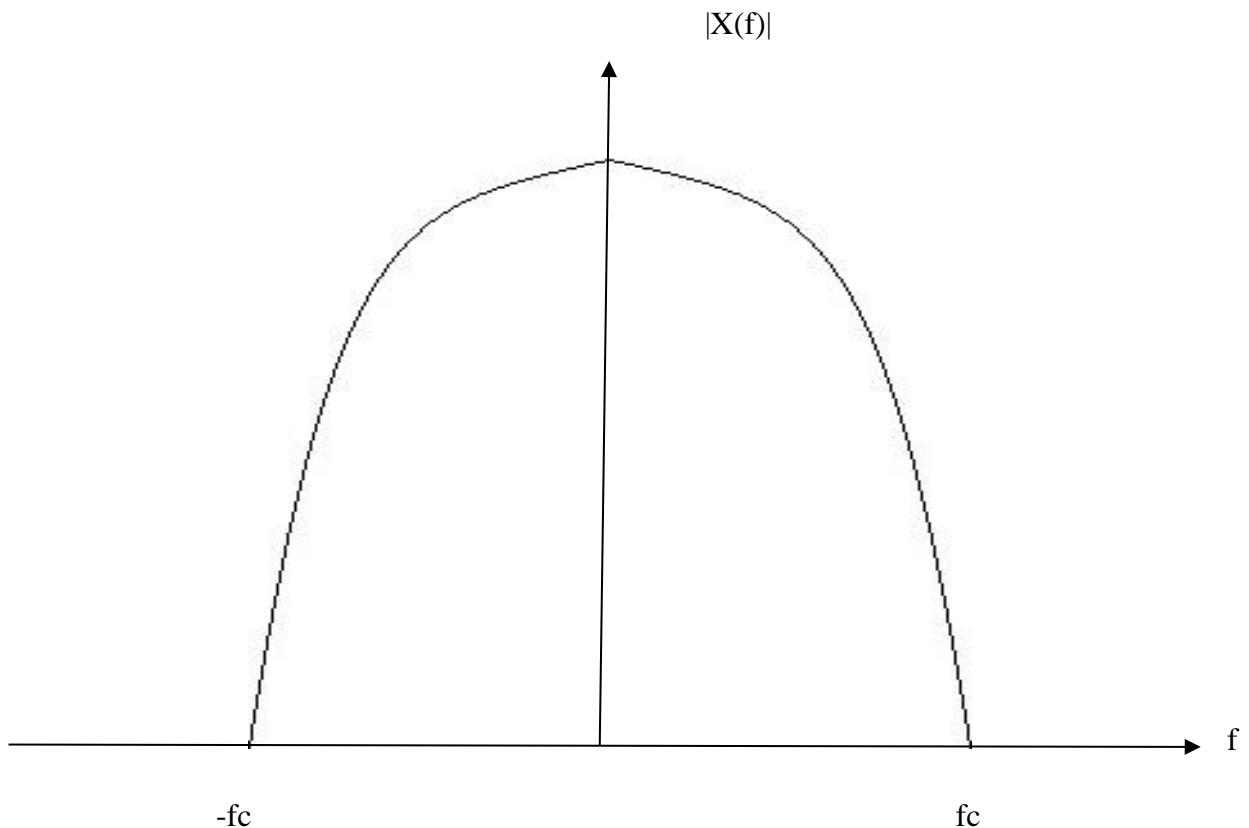


Figura 22: esempio di spettro bilatero.

Uno spettro di questo tipo prende il nome di spettro bilatero. Esso fa uso anche di frequenze negative, prive di significato fisico, ma utili per una rappresentazione analitica.

Per un'analisi spettrale concreta è necessario considerare le sole frequenze positive, senza trascurare tuttavia i contributi della parte sinistra. Data la proprietà di parità dello spettro di ampiezza, è possibile includere tale contributo nel semipiano destro, semplicemente raddoppiandone il modulo, al fine di ottenere dunque uno spettro monolatero. Dai 500 campioni di partenza, circoscritti a un intervallo di frequenze di 250 Hz, l'intero contenuto informativo della monolatera risulterà invece racchiuso in 250 campioni delimitati tra la frequenza nulla ed i 125 Hz. Il rapporto frequenze/campioni definisce la risoluzione, quantificabile a 0.5 Hz.

Il calcolo della FFT e della PSD (densità spettrale di potenza) è stato realizzato dalla funzione `pwelchdet`:

```
function [P, F, X, xm] = pwelchdet (x, Nwind, Nover, Nfft, Fs);
```

forniti in ingresso i dati campionati del segnale (x), il numero di campioni delle epoche ($Nwind$), il numero di campioni di overlap ($Nover$, assunto da noi nullo), il numero di valori di ritorno della `fft` ($Nfft$) e la frequenza di campionamento (Fs), essa offre in uscita la densità spettrale di potenza (P), il vettore di frequenze utili (F), la `fft` (X) e il segnale nel tempo (xm).

La densità spettrale di potenza P è una matrice a tre dimensioni:

- Dimensione 1: potenza spettrale per ogni epoca;
- Dimensione 2: potenza spettrale per bin di frequenza;
- Dimensione 3: potenza spettrale per elettrodo

Con il metodo dei trapezi sono state a questo punto calcolate le potenze nelle bande di frequenza di nostro interesse, che abbiamo definito come:

- Theta (θ): 4 – 8 Hz;
- Alfa (α): 8 – 13 Hz;
- Beta 1 (β_1): 13 - 19 Hz;
- Beta 2 (β_2): 19 – 24 Hz;
- Beta 3 (β_3): 24 – 30 Hz;

Per ogni prova sono stati salvati sei file “.mat”. Cinque di essi contenevano le potenze nelle rispettive bande di riferimento calcolate in ogni epoca e per i singoli elettrodi. Il sesto ed ultimo conteneva invece la potenza nell’intera banda di frequenza utile alla nostra analisi, ovvero tra i 4 ed i 30 Hz, sempre per ogni epoca e per ogni elettrodo. Ad esempio, per la prova `S1_dry_open_1_x`, sono stati salvati i file MATLAB:

- `Ptheta_S1_dry_open_1`;
- `Palfa_S1_dry_open_1`;
- `Pbeta1_S1_dry_open_1`;
- `Pbeta2_S1_dry_open_1`;
- `Pbeta3_S1_dry_open_1`;
- `Pow_S1_dry_open_1`;

Questi file sono stati utilizzati nell’analisi statistica.

5. Analisi statistica

L'analisi statistica è utilizzata per caratterizzare, con l'ausilio della matematica e del metodo scientifico, un fenomeno collettivo. In particolare modo il ramo della statistica inferenziale, cerca di prevedere il comportamento e le caratteristiche di misure effettuate precedentemente con percentuali di errore predeterminate.

L'ANOVA, o 'Analisi della varianza', è un insieme di metodiche facenti parte proprio della statistica inferenziale, che permettono di confrontare più gruppi di dati, analizzandone e paragonandone la variabilità interna ai gruppi stessi rispetto a quella reciproca. L'ANOVA è un test di tipo parametrico, in quanto descrive una distribuzione di frequenze mediante valori numerici (parametri), che si dividono in misure di posizione (media) e di dispersione (varianza, deviazione standard), le cui definizioni e formulazioni sono riportate in seguito:

- Media: sommatoria dei dati divisa per n, cioè il numero dei dati stesso;

$$m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- Varianza: somma quadrata degli scarti rispetto alla media divisa per n-1;

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n - 1}$$

- Deviazione standard: radice quadrata della varianza;

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}}{\sqrt{n - 1}}$$

La statistica inferenziale è molto legata alla teoria della probabilità. Ogni esperimento può dar luogo a diversi risultati o eventi, ad ognuno dei quali la probabilità associa un valore numerico compreso tra 0 ed 1, che rappresenta la possibilità che ha il dato evento di verificarsi.

Sia S l'insieme dei possibili risultati di un esperimento ed A uno dei suoi elementi, ovvero uno degli eventi caratterizzanti l'esperimento stesso. La probabilità che A ha di verificarsi è definita come

$$Pr\{A\} = \lim_{n \rightarrow \infty} n/n_A$$

dove n è il numero di prove effettuate, ed n_A il numero di volte in cui l'evento A si è verificato. $Pr\{A\}$ è un numero compreso tra 0 ed 1, mentre $Pr\{S\} = 1$.

Indicando con la variabile X tutti i possibili risultati di un esperimento, è possibile esprimere la funzione densità di probabilità

$$p(x) = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Pr\{x < X < x + \Delta x\}}{\Delta x}$$

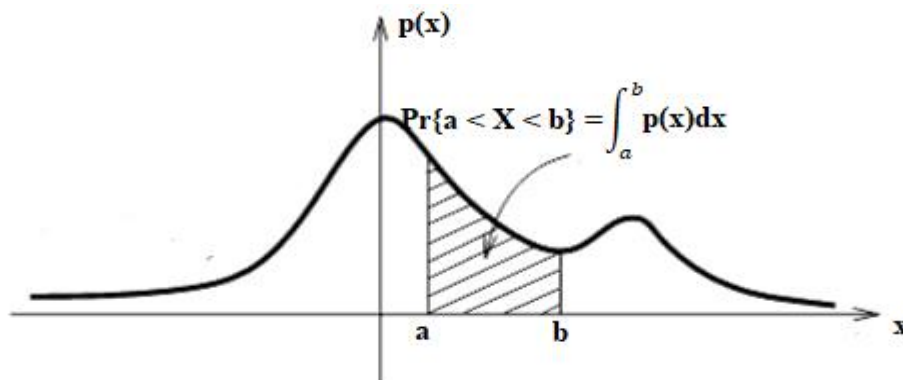


Figura 23: esempio di funzione densità di probabilità.

Data una generica variabile X con funzione di densità di probabilità $p(x)$, è possibile definire $\Pr\{a < X < b\} = \int_a^b p(x)dx$, come mostrato in figura 7.

Per tale variabile continua X , è possibile definire media, varianza e deviazione standard, sostituendo alle precedenti sommatorie degli integrali.

- Media: $\mu = \int_{-\infty}^{\infty} xp(x)dx$
- Varianza: $\sigma^2 = \int_{-\infty}^{\infty} (x - \mu)^2 p(x)dx$
- Deviazione standard: $\sigma = \sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} (x - \mu)^2 p(x)dx}$

Una distribuzione di probabilità per una variabile aleatoria continua molto comune è la distribuzione a campana o curva normale o gaussiana. Una variabile X con media μ e deviazione standard σ è normale se la sua funzione densità di probabilità è:

$$p(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

La variabile normale standardizzata Z ha valor medio nullo e varianza unitaria:

$$p(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}}$$

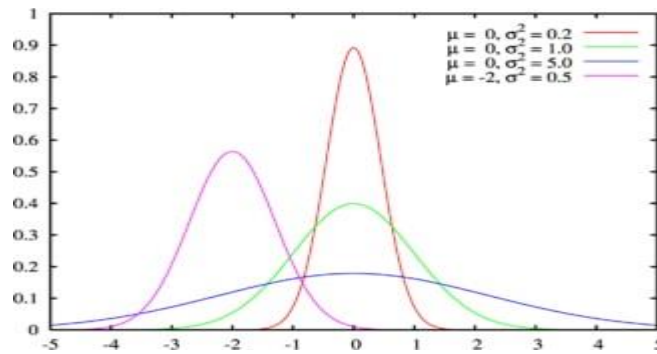


Figura 24: esempi di curve di distribuzione gaussiana.

Attraverso questi principi, è possibile compiere un'inferenza statistica sull'intera popolazione partendo da un campione estratto da essa. Descrivendo con la variabile X la caratteristica della popolazione che si vuole indagare, si noti che essa è descritta da una media μ e da una varianza σ^2 (che sono quelle della popolazione), valori incogniti e costanti che prendono il nome di parametri della popolazione. Estrahendo un campione di n elementi, si calcolano media m e varianza s^2 del campione stesso, che sono sempre diversi a seconda dei campioni estratti e con molta probabilità diversi da quelli dell'intera popolazione (essi non sono altro che due possibili valori assunti da ulteriori variabili aleatorie: la media campionaria M e la varianza campionaria S^2). Il test di ipotesi o test di significatività è uno dei principali metodi per compiere l'inferenza circa la media della popolazione. Esso si basa sulla distribuzione normale della media campionaria M e sulla formulazione di due ipotesi in conflitto:

- H_0 : ipotesi nulla o del “niente fuori dall'ordinario”, che stabilisce che il risultato ottenuto non differisce dai precedenti ($m = \mu$ e $s^2 = \sigma^2$).
- H_1 : ipotesi alternativa ($m \neq \mu$).

Si assume che l'ipotesi nulla sia vera e si valuta l'entità della discrepanza tra quanto osservato sul campione e quanto previsto dall'ipotesi nulla, stabilendo se la discrepanza è “significativa” o “non significativa” a livello α (livello di significatività). Nel primo caso l'ipotesi nulla viene rifiutata con livello di significatività α , nel secondo caso l'ipotesi nulla non può essere rifiutata con livello di significatività α .

Si fissa anzitutto un livello di significanza α , individuando le code della distribuzione normale di M che sottendono un'area pari a $\alpha/2$. Le code indicano le regioni di rifiuto dell'ipotesi nulla. Si assuma per ipotesi che α sia 5%. Se fosse vera H_0 , ci sarebbe una probabilità pari al 95% che la media osservata sul campione cada nell'intervallo interno e solo una probabilità del 5% che cada nelle due code esterne. Quindi se il valore osservato nel campione cade nelle due code esterne è molto probabile che l'ipotesi nulla non sia vera.

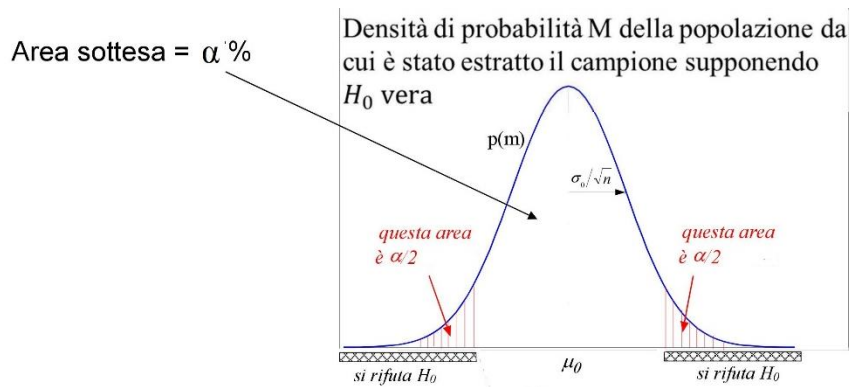


Figura 25: distribuzione normale di M e individuazione delle code con livello di significatività α .

Come risultato del test d'ipotesi, i software per l'analisi statistica forniscono in uscita un valore detto P-value, che indica la probabilità di cadere nell'area sottesa dalle code. Tale valore è una misura della credibilità di H_0 ; la discrepanza da quanto affermato dall'ipotesi nulla sarà tanto maggiore quanto più piccolo è P . H_0 si rifiuta solo con $P < \alpha$.

Scopo dell'analisi è verificare se al variare delle condizioni ambientali a secco e di immersione in acqua vi siano delle alterazioni nell'attività cerebrale in termini di potenza spettrale. L'analisi è stata effettuata singolarmente per tutte le bande di frequenza di nostro interesse, sia nella fase ad occhi aperti che nella fase ad occhi chiusi. Non sono invece state considerate eventuali differenze tra l'attività neuronale ad occhi aperti e chiusi nella stessa condizione ambientale.

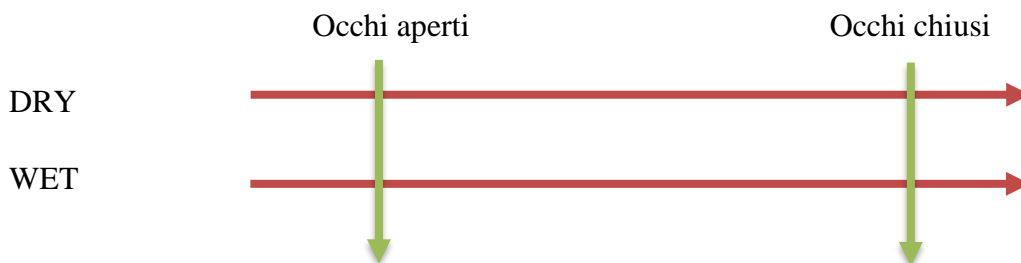


Figura 26: le frecce verdi indicano la 'direzione' privilegiata del confronto, le frecce rosse la 'direzione' al di fuori della presente analisi.

Il primo passo, antecedente l'analisi vera e propria, è stato verificare la gaussianità o meno dei dati a nostra disposizione. Alle singole distribuzioni dei valori di potenza calcolati nelle bande di frequenza theta, alfa, beta1, beta2 e beta3, è stato applicato il test di Kolmogorov-Smirnov. Si tratta di un test non parametrico, il quale assume come ipotesi nulla che i dati in ingresso abbiano una distribuzione normale, contro l'ipotesi alternativa che prevede invece una distribuzione non gaussiana. L'ipotesi nulla viene rifiutata con un livello di significatività del 5%. Per tutti i soggetti e per ogni elettrodo, è risultata una distribuzione dei dati non gaussiana. Ne è un esempio Figura 27.

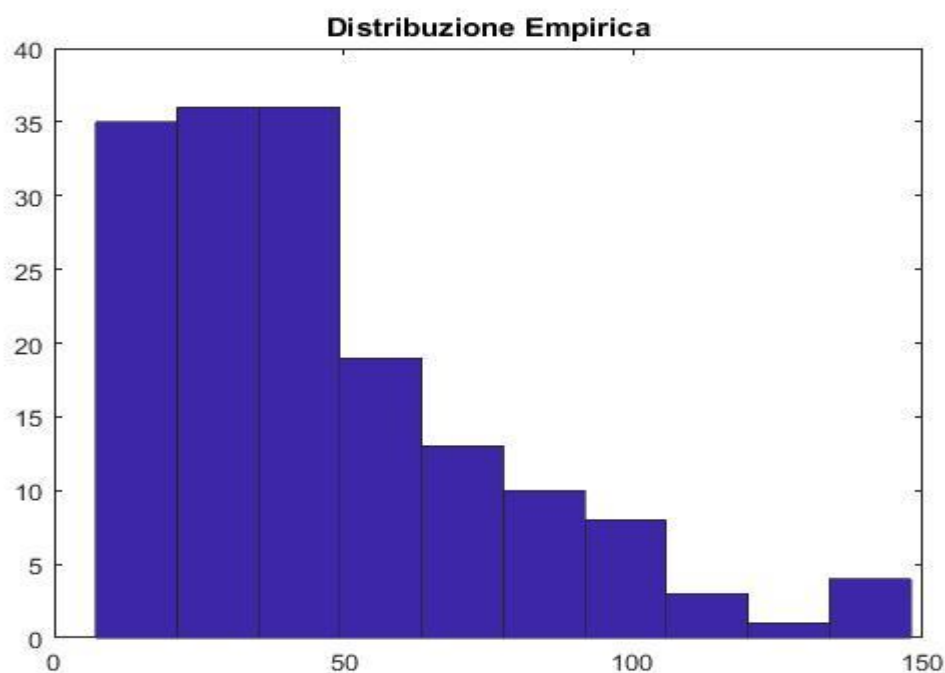


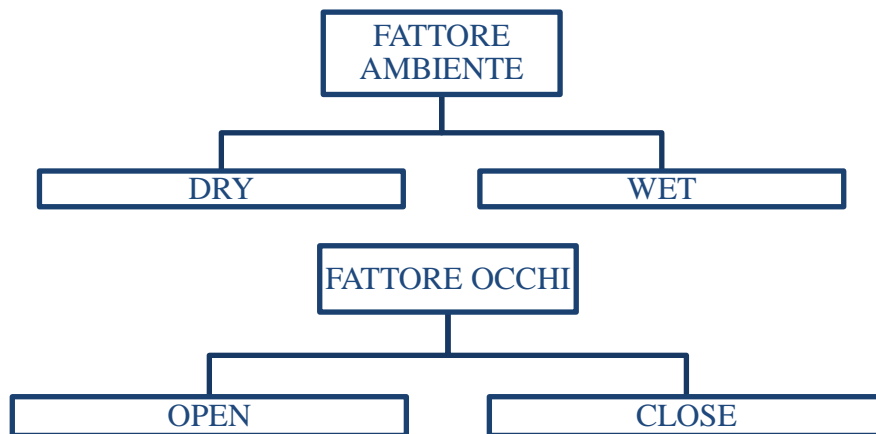
Figura 27: distribuzione empirica dei dati (banda alfa, soggetto 1, elettrodo Fc2, prova dry - open).

Con una distribuzione dei dati di questo tipo non è applicabile il metodo ANOVA. Ciononostante si può ricorrere ad un metodo alternativo, noto come test di Kruskal-Wallis. Esso consiste in un test non parametrico, del tutto analogo all'analisi della varianza, ma utilizzato quando non può essere assunta una distribuzione dei dati gaussiana. Al contrario dell'ANOVA, che sfrutta i parametri di media, varianza e deviazione standard, il test di Kruskal-Wallis impiega mediana e percentili.

- Mediana: è un valore più grande del 50% delle osservazioni e più piccolo del rimanente 50%.
- Percentile: dato relativo al valore h che divide un insieme assegnato di n dati ordinati linearmente, in modo che il numero dei valori inferiori a h costituisca una data percentuale di n .

Il test in questione è in grado di confrontare dati sulla base di diversi fattori, ognuno dei quali è suddiviso in sottolivelli. Nel nostro caso, ad esempio, i fattori in gioco sono due: occhi e ambiente. Il fattore occhi ha i sottolivelli aperti – chiusi, mentre il fattore ambiente ha i sottolivelli dry – wet. Il test funziona fintanto che a variare sia solo uno dei fattori in gioco, mentre l'altro o gli altri rimangono costanti. La presente analisi è limitata dunque al variare di un solo fattore alla volta, motivo per cui, per ipotesi, non si potrebbero valutare le condizioni occhi aperti – dry e occhi chiusi – wet contemporaneamente.

I risultati su cui sono state basate le valutazioni finali sono state ottenute da un'analisi che ha previsto di mantenere inalterato il fattore occhi, variando invece il fattore ambiente, come descritto in figura 26.



Il test fornisce il P-value in riferimento all'ipotesi nulla che i dati provengano dalla stessa distribuzione. L'ipotesi alternativa è che le distribuzioni siano diverse.

Dati provenienti da soggetti diversi non possono essere confrontati se non prima normalizzati rispetto ad una qualche condizione comune. Dopo diverse prove, è stato deciso di normalizzare ogni potenza nelle bande di frequenza theta, alfa, beta1, beta2 e beta3 rispetto alla potenza totale in esse registrata (quindi tra i 4 ed i 30 Hz). La potenza calcolata in ogni epoca in ognuna delle cinque bande è stata divisa per la potenza totale registrata nella stessa finestra, per ognuno dei sedici elettrodi. I dati normalizzati, assumono una distribuzione del tipo mostrato in figura 28.

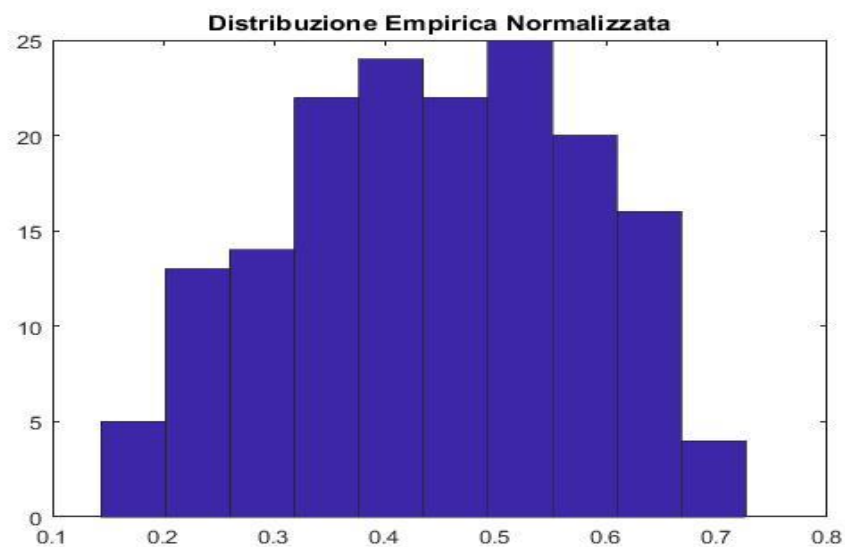


Figura 28: distribuzione empirica dei dati normalizzati (banda alfa, soggetto 1, elettrodo Fc2, prova dry - open).

Sebbene la normalizzazione porti ad una distribuzione che ricorda quella gaussiana, il test Kolmogorov-Smirnov continua a respingere l'ipotesi nulla secondo cui la distribuzione sia normale.

6. Risultati

Il test non parametrico di Kruskal-Wallis è stato eseguito per confrontare le potenze normalizzate nelle bande di frequenza theta, alfa, beta1, beta2 e beta3 dei quattro soggetti. L'analisi statistica ha permesso di valutare eventuali discrepanze nell'attività cerebrale al variare della sola condizione ambientale (a secco, immersione in acqua), mantenendo inalterato il fattore occhi. Il confronto è avvenuto dunque secondo le modalità:

- Open: DRY – WET;
- Close: DRY – WET;

Il test statistico ha fornito in uscita il P-value in riferimento all'ipotesi nulla che i dati provenissero dalla stessa distribuzione, e che quindi non ci fossero differenze tra le potenze nella stessa banda al variare della condizione ambientale. L'ipotesi alternativa, viceversa, assumeva che i dati provenissero da distribuzioni diverse, il che significa che la potenza in banda sarebbe dovuta aumentare o diminuire in modo significativo.

Il livello di significatività con cui l'ipotesi nulla è stata rifiutata è stato fissato al 5%.

I risultati del test sono stati sintetizzati nelle seguenti tabelle, nelle quali, per ogni elettrodo e per ogni banda, è stato indicato se la potenza fosse aumentata o diminuita con un livello di significatività pari al 5%, o se invece non fosse stata registrata variazione alcuna.

	Aumenta in acqua
	Diminuisce in acqua

Theta OPEN

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Alpha OPEN

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Beta1 OPEN

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Beta2 OPEN

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Beta3 OPEN

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Theta CLOSE

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Alpha CLOSE

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Beta1 CLOSE

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Beta2 CLOSE

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Beta3 CLOSE

Fc3 (12)	Fc1 (10)	Fcz(4)	Fc2 (2)	Fc4(6)
C3 (14)	C1 (16)	Cz (15)	C2 (7)	C4(5)
Cp3 (13)	Cp1 (11)	Cpz (1)	Cp2(3)	Cp4 (8)
		Pz (9)		

Accanto ad ogni elettrodo è stato indicato il numero del canale d'acquisizione del dispositivo BCI che ha effettuato la rispettiva registrazione.

Come si evince dalle tabelle, il confronto tra le potenze nelle bande theta, alfa, beta1, beta2 e beta3, calcolate nelle epoche del segnale EEG registrato con i soggetti ad occhi aperti, al variare della condizione ambientale, non ha portato risultati significativi se non per qualche elettrodo isolato. Nello specifico, nessuna variazione degna di nota è stata riscontrata nelle bande theta ed alfa. Per alcuni elettrodi delle bande beta1, beta2 e beta3 sono state invece riscontrate delle diminuzioni di potenza significative.

Per quanto riguarda il confronto effettuato tra le potenze calcolate nella fase in cui il soggetto ha mantenuto gli occhi chiusi, i risultati ottenuti sono stati ben diversi. Fatta eccezione per la banda theta, in cui nessuna variazione significativa è stata riscontrata, se non un aumento per l'elettrodo Cp2, le bande alfa, beta1, beta2 e beta3 hanno riportato per la stragrande maggioranza risultati significativi.

In banda alfa, tutti gli elettrodi hanno registrato una diminuzione di potenza.

In banda beta1, tutti gli elettrodi, con Pz unica eccezione, hanno registrato un aumento di potenza.

In banda beta2, tutti gli elettrodi, con Pz e Fc4 uniche eccezioni, hanno registrato un aumento di potenza.

In banda beta3, tutti gli elettrodi, con Fc4 unica eccezione, hanno registrato un aumento di potenza.

7. Discussione

Un qualche tipo di stimolo è in grado di generare un potenziale evento-correlato (ERP, Event-Related Potential), ma anche di indurre una modifica del segnale EEG in corso attraverso una desincronizzazione (ERD, Event-Related Desynchronization) o una sincronizzazione (ERS, Event-Related Synchronization). Esse costituiscono vari tipi di risposta neuronale da parte di diverse strutture cerebrali.

I potenziali evocati (EP, Evoked Potential) consistono in dei cambiamenti temporanei dell'attività dei neuroni in risposta ad uno stimolo sensoriale. L'assunzione di base che è stata spesso fatta per la spiegazione e rilevazione di questo fenomeno, è che l'attività evocata tempo-dipendente si fosse sommata a quella EEG fisiologica, quest'ultima considerata e valutata come rumore di sottofondo per l'analisi in corso. Un'eliminazione di questa attività, attraverso algoritmi di averaging, avrebbe permesso l'eliminazione del disturbo, aumentando il rapporto segnale-rumore e permettendo l'estrapolazione del potenziale evocato. Tuttavia non tutti gli stimoli afferenti inducono dei potenziali evento correlati di tipo phased-locked, e quindi estraibili con tecniche di averaging temporale del segnale EEG.

Una nuova assunzione che è stata avanzata per la spiegazione di tale fenomeno, è che il potenziale evocato sia il risultato di una riorganizzazione fasica dell'attività neuronale. È noto infatti, ad esempio, che alcuni eventi possano desincronizzare o addirittura bloccare l'attività alfa. Queste modifiche sono sempre tempo-correlate all'evento scatenante, con la peculiarità di non essere "phased-locked", ovvero di non aver nessuna dipendenza reciproca riguardante la fase dei segnali. Con questa nuova ipotesi, le valutazioni che vengono effettuate non sono nuovamente conseguibili con metodi lineari come l'averaging, ma con un'analisi nel dominio delle frequenze.

Ogni evento scatena un cambiamento dell'attività EEG in specifiche bande di frequenza, che potrebbe consistere, in termini generali, in un aumento o in una diminuzione della potenza in banda stessa. L'ipotesi è che questa variazione positiva o negativa di potenza possa essere dovuta rispettivamente a fenomeni di sincronizzazione e desincronizzazione della popolazione di cellule neuronali delle aree corticali interessate. Il primo dei due fenomeni è denominato ERS, sincronizzazione evento-correlata, mentre il secondo ERD, desincronizzazione evento-correlata.

A differenza degli ERP tradizionali, che possono essere considerati come risposte post-sinaptiche transitorie dei neuroni piramidali innescate da specifici stimoli sensoriali, le desincronizzazioni o sincronizzazioni evento-correlate potrebbero essere scatenate dal modificarsi di uno o più parametri, i quali controllano l'oscillazione e quindi le fasi dei segnali elettrici generati dai neuroni [7].

I fattori che controllano l'oscillazione del segnale EEG sono:

- Proprietà della membrana della cellula neuronale e dinamica dell'attività sinaptica.
- Circuiti ed interconnessioni neuronali (percorsi talamo-corticali e cortico-corticali).
- Influenza modulatrice locale o generale del neurotrasmettitore.

In questo modo sono state definite le due modalità di risposta neuronale scatenate da uno stimolo: il potenziale evento-correlato, inteso come risposta corticale dovuta ad un cambiamento nell'attività afferente, e i vari ERD ed ERS, rappresentanti variazioni nell'attività di interazione tra i neuroni e gli interneuroni che controllano le componenti in frequenza del segnale EEG.

I risultati ottenuti dall'analisi statistica, hanno dimostrato come durante la permanenza ad occhi chiusi dei soggetti in acqua, tutti gli elettrodi abbiano registrato una diminuzione della potenza in banda alfa, se paragonati alla medesima condizione, ma a secco. Questo potrebbe essere dovuto ad una desincronizzazione delle popolazioni neuronali delle aree corticali sotto indagine.

L'aumento della concentrazione di emoglobina ossigenata nelle aree S1, PAA, M1 e SMA riscontrata con l'indagine fNIRS, potrebbe essere correlata all'aumento dell'eccitabilità corticale registrata attraverso studi che hanno impiegato la stimolazione magnetica transcranica per la valutazione di MEP in condizione di immersione. L'aumento dell'eccitabilità, che consiste in un aumento di sensibilità e di prontezza alla risposta conseguente ad uno stimolo da parte di un neurone, è stato identificato sia in condizione di movimento che di riposo [4]. Esso si presenta in concomitanza di un segnale EEG desincronizzato in banda alfa [8], il che suggerisce che l'ERD possa agire come da fattore di attivazione di aree cerebrali con il compito di processare informazioni afferenti [9], come quelle provenienti da uno stimolo sensoriale. Un ERD più intenso e diffuso potrebbe essere il risultato del coinvolgimento di una rete neuronale più grande o di più gruppi cellulari nell'elaborazione delle informazioni [10].

L'input sensoriale scatenato dall'immersione in acqua incrementa dunque l'attivazione di alcune aree corticali e subcorticali dell'encefalo, in particolar modo aumentando la sensibilità della corteccia sensoriale e della corteccia motoria, il che potrebbe facilitare l'apprendimento o il recupero di skills motorie durante la riabilitazione [2]. Risultati che avvalorano questa ipotesi, sono stati ottenuti dall'analisi di ERD durante un esperimento che prevedeva l'apprendimento di una esplicita sequenza motoria di pressione di un pulsante attraverso differenti dita della mano. La fase di apprendimento è stata accompagnata da un aumento della desincronizzazione in banda mu nella regione controlaterale. I ritmi mu, detti anche ritmi sensori-motori, sono modelli sincronizzati di attività elettrica che coinvolgono un gran numero di neuroni, probabilmente del tipo piramidale, nella parte del cervello

che controlla il movimento volontario. Come il ritmo alfa, sono caratterizzati da frequenze di oscillazione tra gli 8 ed i 13 Hz, ma a differenza del primo, che compare per lo più nelle aree occipitali dell'encefalo, i ritmi mu originano approssimativamente nella corteccia motoria.



Figura 29: in verde è evidenziata la parte sinistra della corteccia motoria; in essa sono individuati i ritmi mu, così come nella corteccia motoria destra.

Una volta che la sequenza è stata appresa, e l'esecuzione di tale movimento risulta più "automatica", l'effetto di desincronizzazione si riduce. Questi risultati suggeriscono fortemente che l'attività nelle aree sensori motorie primarie aumenta in associazione all'apprendimento di un nuovo compito motorio e diminuisce quando il compito è stato appreso [11].

Come già detto, l'ipotesi da noi avanzata per spiegare i risultati ottenuti dall'analisi statistica, ovvero che la potenza in banda alfa diminuisce in modo significativo in tutti gli elettrodi al variare delle condizioni ambientali dry – wet quando i soggetti mantengono gli occhi chiusi, è che lo stimolo somato sensoriale prodotto dall'acqua possa indurre una desincronizzazione degli elementi neuronali, ovvero una soppressione della sincronia di un gran numero di neuroni, il cui risultato è appunto la diminuzione di potenza in banda.

È già stato dimostrato che stimoli somato sensoriali attenuano il ritmo alfa corrente nella corteccia centro parietale [12]. Dato che l'acqua agisce come forma multimodale di stimolo sensoriale, è possibile che anch'essa possa rendersi protagonista di questo effetto.

Questa ipotesi potrebbe essere confermata dal fatto che siano stati registrati degli effetti modulatori su componenti dei SEPs a breve latenza di cui è nota l'origine nelle regioni parietale (P25) e centrale (P45), suggerendo che l'immersione possa influenzare il processamento corticale dello stimolo somato sensoriale proveniente da nervi periferici [1].

Non è chiaro tuttavia in che modo questo possa avvenire. Un tentativo di valutazione dell'alterazione del ritmo alfa nell'area sensori-motoria in seguito all'afferenza di stimoli somato sensoriali, è stato effettuato mediante l'applicazione steady-state di uno stimolo elettrico sinusoidale a 3 KHz con diverse intensità, sebbene le conoscenze su come questo tipo di afferenza possa modificare l'attività corticale siano limitate.

La funzione cognitiva può essere stimata analizzando le oscillazioni cerebrali nell'elettroencefalogramma (EEG). Una diminuzione (desincronizzazione correlata all'evento ERD) o un aumento (Sincronizzazione correlata all'evento ERS) della potenza nel ritmo corticale possono essere utilizzati come strumento oggettivo per la valutazione di task sensoriali [13]. La soppressione del ritmo alfa (8-13 Hz) è stata associata a eventi o task specifici, e potrebbe essere causata dalla connettività corticale tra la corteccia somato sensoriale e motoria con altre aree integrative coinvolte nei diversi aspetti della progettazione e dell'esecuzione del movimento [14].

Questo suggerisce che l'attivazione corticale innescata da un input sensoriale, partendo dall'area somato-sensoriale, possa poi essere trasmessa verso l'area motoria attraverso vie cortico-corticali e talamo-corticali, grazie ad un cambiamento nell'efficienza sinaptica e nell'organizzazione motoria e sensorimotoria [1].

I risultati ottenuti dalla stimolazione steady-state sono riconducibili e simili a quelli ricavati dalla nostra analisi. Durante lo stimolo infatti sono state registrate delle attenuazioni in banda alfa nella corteccia centrale bilateralmente, nella corteccia prefrontale ipsilaterale e nella corteccia parietale controlaterale.

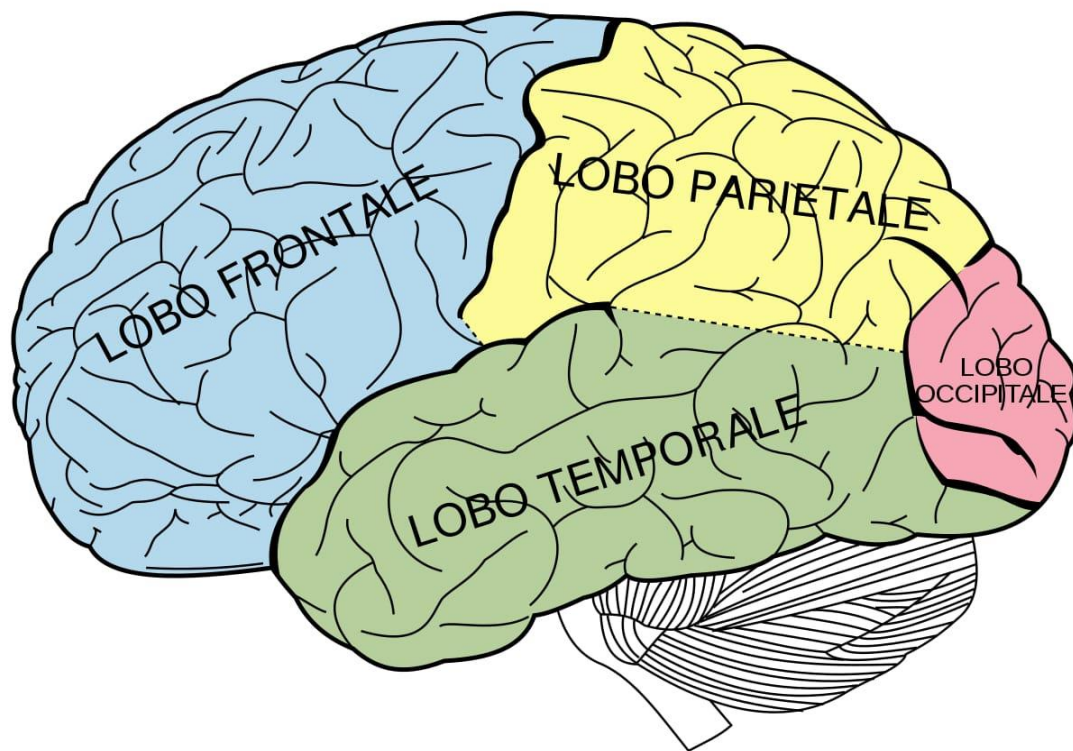


Figura 30: suddivisione dell'encefalo in lobi.

La stimolazione sensoriale prodotta dall'acqua risulta essere continua e prolungata, il che potrebbe spiegare la permanenza dell'effetto di desincronizzazione nel corso delle prove.

Il fattore occhi potrebbe aver giocato un ruolo decisivo nei risultati dell'analisi statistica. Il confronto tra le potenze nelle varie bande di nostro interesse non hanno portato risultati di importanza significativa o degna di nota nella prova ad occhi aperti, al contrario di quanto è stato per quella ad occhi chiusi. Una spiegazione ragionevole è che lo stimolo visivo possa in qualche modo avere un effetto di saturazione, che non permette di apprezzare eventuali effetti indotti dall'afferenza sensoriale del contatto con l'acqua.

Conclusioni

Gli obiettivi del presente studio sono stati di valutare se, ed eventualmente in che modo la condizione di immersione in acqua potesse alterare l'attività cerebrale. I benefici terapeutici indotti dall'immersione sono infatti legati a fattori fisici (temperatura, pressione idrostatica, ...), mentre ben poco si conosce riguardo l'effetto che tale condizione ha sul condizionamento neuronale. L'acqua è in grado di influenzare il processamento corticale dello stimolo somato sensoriale, aumentando inoltre le attività di alcune zone corticali e subcorticali dell'encefalo, come hanno dimostrato esperimenti con l'indagine non invasiva fNIRS. È stato suggerito che questi processi possano in qualche modo facilitare il recupero di skills motorie nei processi riabilitativi in pazienti emiplegici, colpiti da ictus o di neurologia in generale, condizioni spesso accompagnate da disfunzioni sensoriali. Tutto questo rimane però da dimostrare.

In conclusione, l'immersione in acqua induce una diminuzione della potenza in banda alfa in prossimità delle aree sensori-motorie e motorie, causata da una desincronizzazione degli elementi neuronali in prossimità di tali aree. L'eliminazione dello stimolo visivo, e dunque l'esposizione ad un numero minore di tipi di stimolazione, rende apprezzabile l'effetto di soppressione causato dall'acqua sulla sincronia del blocco di neuroni. L'effetto di desincronizzazione risulta in un aumento dell'eccitabilità corticale [9], e dunque della sensibilità e prontezza alla risposta neuronale che segue un qualche tipo di stimolazione.

I limiti imposti dal numero di elettrodi con cui è stato possibile acquisire e studiare il segnale EEG, non hanno permesso l'indagine di possibili ulteriori effetti nelle restanti aree cerebrali. Una maggiore densità di elettrodi, potrebbe non solo permettere la valutazione di fenomeni oltre le aree somato sensoriali e sensori-motorie, ma anche permetterne una migliore localizzazione.

Bibliografia

1. Daisuke Sato, Koya Yamashiro, Hideaki Onishi, Yoshimitsu Shimoyama, Takuya Yoshida, Atsuo Maruyama (2012) The effect of water immersion on short-latency somatosensory evoked potentials in human. Sato et al. *BMC Neuroscience*.
2. Daisuke Sato, Hideaki Onishi, Koya Yamashiro, Tatsuya Iwabe, Yoshimitsu Shimoyama, Atsuo Maruyama (2011) Water Immersion to the Femur Level Affects Cerebral Cortical Activity in Humans: Functional Near-Infrared Spectroscopy Study. *Brain Topogr* (2012) 25:220–227.
3. Daisuke Sato, Koya Yamashiro, Hideaki Onishi, Yasuhiro Baba, Sho Nakazawa, Yoshimitsu Shimoyama, Atsuo Maruyama (2014) Whole-Body Water Flow Stimulation to the Lower Limbs Modulates Excitability of Primary Motor Cortical Regions Innervating the Hands: A Transcranial Magnetic Stimulation Study. *PLoS ONE* 9(7).
4. Daisuke Sato, Koya Yamashiro, Hideaki Onishi, Baba Yasuhiro, Yoshimitsu Shimoyama, Atsuo Maruyama (2014) Whole-hand water flow stimulation increases motor cortical excitability: a study of transcranial magnetic stimulation and movement-related cortical potentials. *J Neurophysiol* 113: 822–833.
5. G. Buzsaki, C. A. Anastassiou, e C. Koch (2012) The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spike. *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, n. 6, pagg. 407–420.
6. Nunez P., Srinivasan R. (2006) *Electric Fields Of The Brain*. Oxford Univ. Press.
7. Lopes da Silva FH (1991) Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroenceph clin Neurophysiol* 1991;79:81±93.
8. Steriade M, Llinas R. (1988) The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Phys Rev* 1988;68:649±742.
9. Pfurtscheller G. Event-related synchronization (ERS): an electrophysiological correlate of cortical areas at rest. (1992) *Electroenceph clin Neurophysiol* 1992;83:62±69.
10. Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH (1999) Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clinical Neurophysiology* 110: 1842-1857.
11. Zhuang P, Toro C, Grafman J, Mangano P, Leocani L, Hallett M. (1997) Event-related desynchronization (ERD) in the alpha frequency during development of implicit and explicit learning. *Electroenceph clin Neurophysiol* 1997;102:374±381.
12. LP Volpi, CJ Tierra-Criollo (2017) Cortical Alpha Oscillation During 3 kHz Steady-State Sinusoidal Electric Current Stimulation. *Journal of Neurology & Stroke*, Volume 7 Issue 1.
13. Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH (1999) Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clin. Neurophysiol* 110(11): 1842-1857.
14. Neuper C, Pfurtscheller G (2001) Event-related dynamics of cortical rhythms: frequency-specific features and functional correlates. *Int J Psychophysiol* 43(1): 41-58.