



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE MOTORIE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

**Estrazione, gestione e organizzazione di dati di neuroelettrofisiologia
delle aree V6A, PE e PEc in architettura gerarchica**

Relatore

Patrizia Fattori

Correlatore

Francesco Edoardo Vaccari

Presentata da

Marco Cuscunà

N°Matricola

1059411

A.A. 2023/2024

Sessione unica

Indice

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1. Il mondo dell'elettrofisiologia	2
1.2. Il Data Sharing e il formato HDF5	2
1.3. La corteccia parietale posteriore di Macaco	4
1.3.1. L'area PE	7
1.3.2. L'area P _{EC}	8
1.3.3. L'area V6A	9
2. SCOPO DELLA TESI	10
3. MATERIALI E METODI	11
3.1. Implicazioni etiche	11
3.2. Sessioni di registrazione	12
3.3. Estrazione e preparazione dei dati	15
3.3.1. Indicizzazione dell'estrazione	15
3.3.2. Procedura di estrazione dei dati dal server	16
3.4. Organizzazione dei dati in formato HDF5	17
3.5. Processo di analisi dati	19
3.5.1. Raster Plot	19
3.5.2. Interspike Interval	20
3.5.3. Movimento degli occhi	21
4. RISULTATI	22
4.1. Analisi attraverso Raster Plot	23
4.2. Analisi attraverso Interspike Interval	25
4.3. Analisi del movimento oculare	27
5. DISCUSSIONE	29
6. CONCLUSIONI	32
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	33

ABSTRACT

I movimenti quotidiani, come camminare, muovere un braccio o afferrare un oggetto, sono il risultato di una complessa attività neurale. Diversi neuroni collaborano per elaborare stimoli visivi, definire la posizione del corpo nello spazio, la distanza degli oggetti e generare il movimento. Questi processi coinvolgono reti neurali complesse che includono aree cerebrali del lobo parietale superiore come V6A, PEc e PE. Tuttavia, la comprensione completa di questi processi ancora non è stata raggiunta e la ricerca è quindi in corso. Durante il lavoro di tesi sono stati trattati dati elettrofisiologici registrati da due primati non-umani, durante tre compiti di raggiungimento e presa (con fissazione costante, presa costante e foveale, tutti in completa oscurità) verso 9 bersagli. I dati sono stati raccolti e organizzati in file HDF5, un formato facilmente utilizzabile e compatibile con MATLAB e Python. Sono state poi effettuate analisi sulla qualità dei dati studiando la posizione dello sguardo durante il compito e la qualità delle registrazioni dei potenziali d'azione, valutando, attraverso l'uso di script MATLAB, la percentuale di violazione del periodo refrattario tra un potenziale e il successivo. La registrazione e organizzazione di questi dati delle varie aree cerebrali è fondamentale per la ricerca, e utilizzare formati come HDF5, permette di ottenere dati ben catalogati e ordinati, rappresentando un esempio di sana condivisione dei dati a beneficio della comunità scientifica. La condivisione incentiva la ricerca e facilita traguardi importanti, come l'istruzione di intelligenze artificiali in grado di interpretare i segnali neurali, convertendo i potenziali d'azione in movimenti di protesi artificiali, per ripristinare le abilità motorie in pazienti disabili a causa di lesioni o malattie neurodegenerative.

1. INTRODUZIONE

1.1. Il mondo dell'elettrofisiologia

L'elettrofisiologia costituisce un campo essenziale della fisiologia, dedicato all'analisi delle proprietà elettriche delle cellule e dei tessuti. All'interno dell'organismo, alcune categorie cellulari, tra cui le cellule muscolari e nervose, manifestano la capacità di generare potenziali d'azione mediante la generazione di gradienti elettrochimici attraverso specifici canali localizzati sulle loro membrane cellulari. Tali canali possono essere modulati da molecole chimiche che inducono l'apertura o la chiusura dei medesimi, nonché da differenze di potenziale create da altri canali. Questo complesso meccanismo di apertura e chiusura, operato in modo sequenziale, consente la propagazione del segnale elettrico alle regioni adiacenti, facilitando così la trasmissione efficiente delle informazioni all'interno del sistema biologico (Carter & Shieh, 2015).

Una branca fondamentale dell'elettrofisiologia è rappresentata dalla neuroelettrofisiologia, la quale si focalizza specificatamente sull'analisi dei complessi meccanismi che governano la trasmissione delle informazioni a livello nervoso. Tale disciplina si dedica alla comprensione della modalità con cui queste informazioni vengono integrate e, successivamente, tradotte in risposte a livello dei differenti distretti corporei. A tal proposito, la tecnologia odierna ha permesso lo sviluppo di tecniche avanzate di registrazione e stimolazione che possono permettere di analizzare i pattern elettrici del cervello e dei muscoli, individuando importanti informazioni per la diagnosi e il trattamento di patologie, ma anche per studiare il normale funzionamento di tali distretti. Un'interessante applicazione di queste conoscenze è la messa a punto di interfacce uomo-macchina ai fini della progettazione di protesi complesse che possano andare a sostituire le funzionalità di arti danneggiati, migliorando la qualità di vita dei pazienti affetti da lesioni cerebrali, paralisi e altre condizioni motorie invalidanti. Essendo questi esperimenti molto invasivi, a parte casi particolari, i dati di elettrofisiologia vengono raccolti in modelli animali come roditori o primati non umani. A tal riguardo, per questo elaborato di tesi sono stati trattati dati registrati da esemplari di *Macaca fascicularis*, che per le caratteristiche anatomiche e funzionali (vedi paragrafo 1.3 “*La corteccia parietale posteriore di macaco*”), è una delle specie più utilizzate per questo tipo di esperimenti.

1.2. Il Data Sharing e il formato HDF5

Nel mondo odierno la condivisione dei contenuti è il pilastro fondante della società. Tale concetto si ritrova anche nella scienza moderna, dove il Data Sharing consente di agevolare la replicabilità dei risultati ottenuti, permettendo anche lo svolgimento di studi su vasta scala, favorendo la collaborazione di istituti di ricerca diversi, in varie parti del mondo, in modo coordinato e funzionale. Questa pratica assume anche ulteriore importanza nel contesto della ricerca sugli animali. Lo scambio di dati, infatti, offre l'opportunità di utilizzare

le informazioni ottenute dalla sperimentazione animale in modo più efficiente, evitando ripetizioni non necessarie (Hubrecht & Carter, 2019). Tale approccio, è dunque conforme alla riduzione del numero di animali utilizzato nei test scientifici, applicando i principi delle 3Rs (Russel & Burch, 1959). Purtroppo, le pratiche di condivisione di dati non hanno ancora raggiunto linee guida standardizzate rendendo non del tutto agevole l'accessibilità, a causa anche della mancanza di chiarezza e documentazione dettagliata. Finora, si stima che le richieste di dati vengono ignorate nel 14-41% dei casi, mentre il successo nell'ottenimento dei dati è raggiunto solamente nel 27-59% delle istanze (Diomedi et al., 2024). Tenendo conto di questi aspetti, il lavoro di tesi si pone quindi l'obiettivo di agevolare il Data Sharing di dati di elettrofisiologia garantendone accessibilità e riutilizzabilità, grazie all'organizzazione in un formato di file Hierarchical Data Format 5 (HDF5).

Un file di formato HDF5 si struttura come un grosso contenitore di dati, organizzato tramite una struttura gerarchica (Fig.1) composta da due categorie di oggetti: i gruppi, che forniscono informazioni riguardo la struttura organizzativa, e i dataset che contengono i dati veri e propri. I gruppi sono paragonabili a cartelle in un sistema di file informatico, mentre i dataset sono gli array multidimensionali di elementi contenenti numeri interi, decimali o semplici stringhe di testo. A ciascun elemento, gruppo o dataset, possono anche essere associati i metadati (che nella seguente tesi si definiranno col nome di attributi) come etichette, rendendo comoda e immediata la fruizione di fondamentali informazioni utili alla comprensione dei dati contenuti, senza il bisogno di specifiche esterne, o ulteriori file di documentazione.

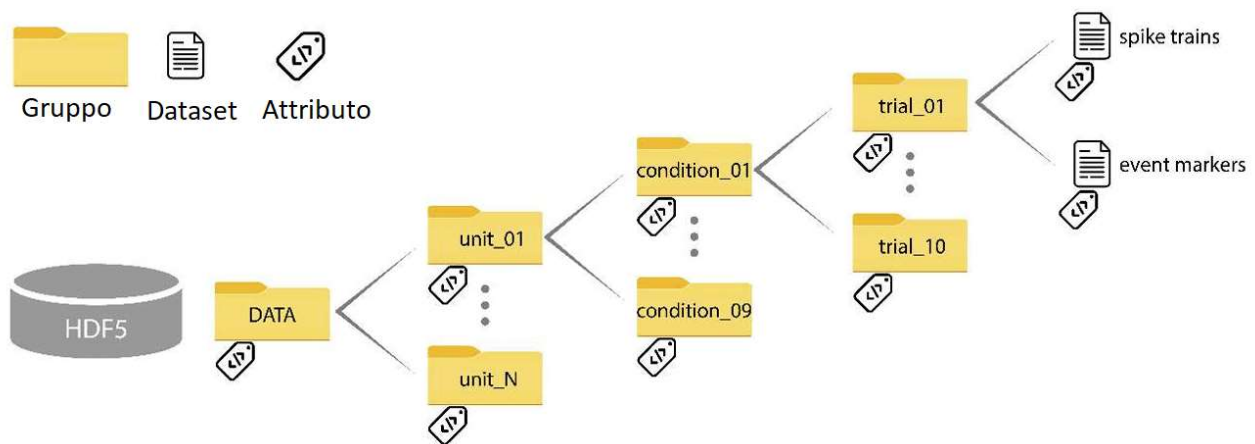


Figura 1 Rappresentazione schematica della struttura gerarchica dei file HDF5. È possibile notare l'organizzazione in gruppi e dataset. I gruppi, proprio come delle cartelle informatiche, possono contenere i dataset o altre sottocartelle. A ciascun oggetto, poi possono essere associati gli attributi, ovvero i metadati contenenti informazioni fondamentali alla comprensione dei dati contenuti (adattata da Diomedi et al., 2024).

Di conseguenza, la struttura gerarchica che consente di organizzare in modo ordinato grandi insiemi di dati, e la possibilità di assegnare a ciascun oggetto degli attributi, capaci di sopperire a problemi di comprensione dei medesimi, rendono tale formato una scelta popolare per la gestione e lo scambio di dati scientifici. Inoltre, come già anticipato, tale formato, può gestire una vasta gamma di tipi di dati, compresi array

multidimensionali permettendo di comprimerli, riducendone di conseguenza lo spazio di archiviazione necessario, senza comprometterne l'integrità o l'accessibilità e facilitandone il trasferimento. È importante, anche, nominare il supporto della funzionalità di "data slicing", ovvero del taglio di dati, mediante il quale è possibile estrarre dataset o sottoinsiemi di dataset specifici per effettuarne poi l'elaborazione e l'analisi. Questo significa che ogni qual volta si debba eseguire un'analisi relativa a dataset o gruppi particolari contenuti nel file non sia necessario processare l'intera architettura, ma solo le porzioni di interesse, rendendo più efficiente il lavoro con strutture di dati molto grandi. Infine, HDF5 non richiede licenze essendo un formato Open Source, e può essere facilmente elaborato da MATLAB e da Python, i due principali linguaggi di programmazione utilizzati nella comunità neuroscientifica per l'analisi dei dati, oltre che presentare una compatibilità sulla maggior parte dei sistemi operativi attualmente disponibili (Mac, Windows, Linux).

1.3. La corteccia parietale posteriore di Macaco

La porzione più esterna del cervello prende il nome di corteccia cerebrale, uno strato di materia grigia, spesso tra i due e i quattro millimetri, che riveste completamente la superficie dei due emisferi. La corteccia cerebrale del macaco (così come quella dell'uomo), può essere suddivisa generalmente in quattro lobi (*Fig.2*):

Il lobo parietale è coinvolto principalmente nelle sensazioni somatiche e nella formazione di un'immagine corporea relazionata allo spazio extrapersonale; il lobo occipitale è coinvolto nelle facoltà visive; il lobo frontale è coinvolto nella produzione dei movimenti, nella memoria a breve termine e nella pianificazione delle azioni future; il lobo temporale è coinvolto nell'ascolto e nell'apprendimento (Kandel et al., 2012).

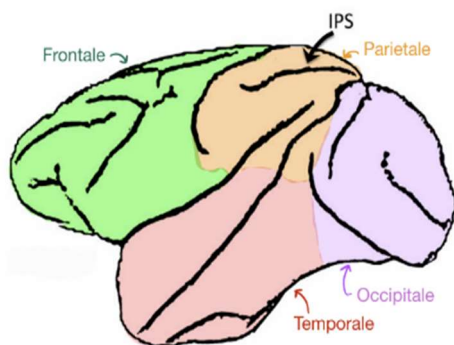


Figura 2 Rappresentazione laterale dei lobi del cervello del macaco. In arancione si ha il lobo parietale, in viola il lobo occipitale, in verde il lobo frontale e in rosso il lobo temporale; IPS è il solco intraparietale. (adattata da Hickok, 2009).

Tale corteccia si può suddividere in corteccia parietale anteriore (APC) e corteccia parietale posteriore (PPC). La PPC dei primati ospita aree associative coinvolte nell'elaborazione degli stimoli somatosensoriali e visivi. La PPC, inoltre può essere ulteriormente suddivisa in lobulo parietale superiore (SPL) e lobulo parietale inferiore (IPL) (*Fig.3*). Questi due lobuli sono separati l'uno dall'altro dal solco intraparietale (IPS; *Fig.2*) (Borra & Luppino, 2017).

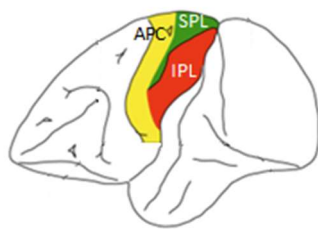


Figura 3 Rappresentazione delle aree del lobo parietale. In giallo si ha la corteccia parietale anteriore (APC), in verde e rosso la corteccia parietale posteriore (PPC). La PPC può essere ulteriormente suddivisa in lobulo parietale superiore (SPL) rappresentata dalla regione verde, e lobulo parietale inferiore (IPL) corrispondente alla regione rossa. Questi due lobuli sono separati l'uno dall'altro dall'IPS (Fig.2) (adattata da Gamberini et al., 2020).

La struttura della PPC, e in particolar modo dell'SPL del macaco presenta notevoli similitudini rispetto a quella umana (Fig.4). In particolar modo i due SPL possiedono la medesima organizzazione strutturale con un settore anteriore dominato dal sistema somatosensoriale, centralmente dal sistema bimodale e nella porzione caudale da aree coinvolte in risposte a stimoli esclusivamente visivi (Gamberini et al., 2020).

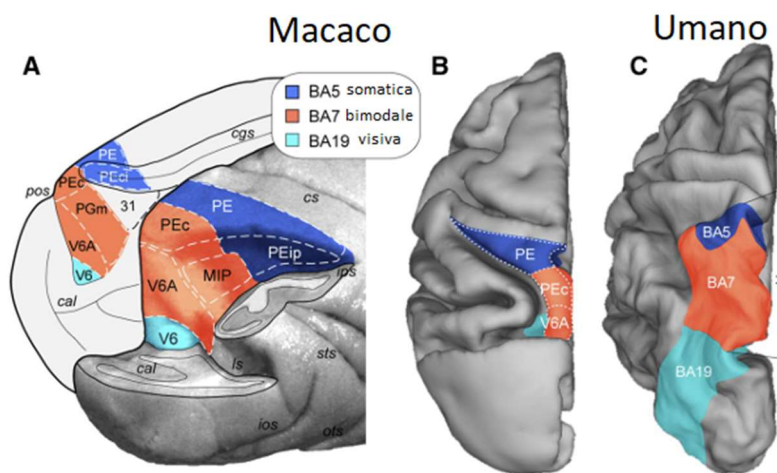


Figura 4 Rappresentazione del confronto del SPL tra cervello di *Macaca Fascicularis* rispetto a quello di uomo. Di colore arancione si rappresentano le aree coinvolte negli stimoli sia visivi che somatosensoriali, in blu quelle responsive agli stimoli esclusivamente somatosensoriali e in azzurro quelle coinvolte esclusivamente nella risposta agli stimoli visivi. In A si ha la vista posterolaterale del cervello di macaco in cui sono state evidenziate le aree principali V6A, MIP, PE, PEip, PEC dell'SPL; in B si evidenziano le medesime aree attraverso una vista dorsale del medesimo cervello; in C si ha la vista dorsale del cervello di umano in cui sono evidenziate le aree BA5, BA7 e BA19 rispettivamente coinvolte all'elaborazione di risposte somatosensoriali, bimodali (sia somatosensoriali che visivi) e esclusivamente visivi (adattata da Gamberini et al., 2020).

L'SPL, secondo Brodmann (1909), presenta due campi citoarchitettonici; l'area 5 anteriormente e l'area 7 posteriormente (Fig.5). L'area 5 è coinvolta principalmente nell'elaborazione delle informazioni somatosensoriali provenienti da diverse parti del corpo, come l'interpretazione delle sensazioni tattili, di pressione, temperatura e dolore. Inoltre è coinvolta nella rappresentazione spaziale del corpo e nella percezione della posizione e del movimento degli arti, oltre che nella capacità di eseguire movimenti manuali (Premji et al., 2011). L'area 7 invece è coinvolta principalmente nella percezione ed elaborazione delle informazioni visive relative allo spazio e alla percezione tridimensionale, e nell'integrazione di tali informazioni per guidare i movimenti del corpo e per costruire una rappresentazione mentale dello spazio

circostante (Le et al., 2017). Inizialmente si pensava che si avesse una differenza sostanziale della zona cerebrale occupata dalle aree 7 e 5 tra macaco e umano. Nell'uomo l'area 7, secondo Brodmann (1909), sembrava occupare la maggior parte dell'SPL, a differenza dell'area 5 che risultava essere una regione più ristretta nella porzione caudale dell'SPL. Nel macaco, invece, si aveva la situazione opposta; l'area 5 si riteneva occupasse la maggior parte dell'SPL, mentre l'area 7 risultasse più circoscritta nella porzione caudale (Fig.5). Ricerche successive presentarono l'idea secondo cui l'SPL di macaco fosse occupato interamente dall'area 5 di Brodmann (Vogt & Vogt, 1919). Tuttavia, stando alle evidenze odierne, l'SPL di macaco ospita anche una regione corticale relativamente ampia che presenta caratteristiche strutturali e funzionali simili a quelle dell'area 7 (Gamberini et al., 2020; Impieri et al., 2019; Luppino et al., 2005; Seltzer & Pandya, 1986) similmente a quanto accade nell'uomo che però si estende nascosta nella parete anteriore del solco parieto-occipitale, nella parete superiore del solco intra-parietale e medialmente nella scissura interemisferica.

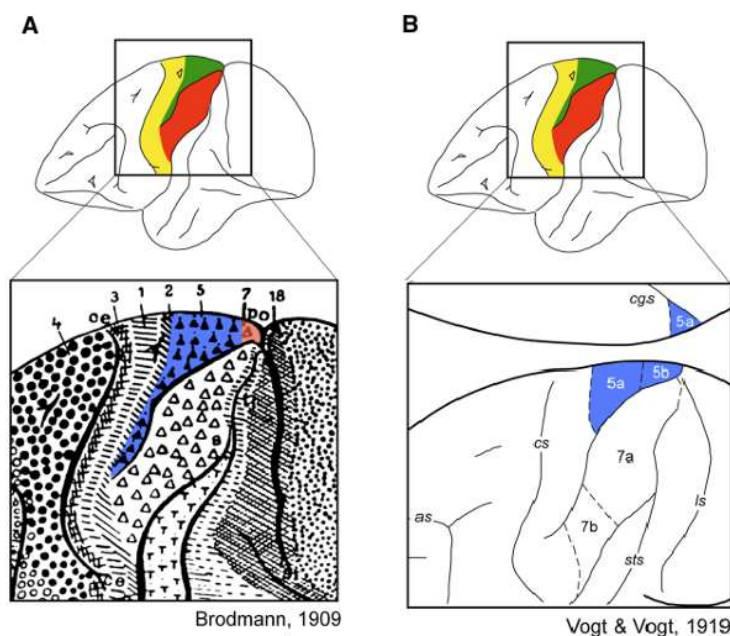


Figura 5 Rappresentazione delle aree di Brodmann al livello dell'SPL di macaco. In A si nota l'area colorata di blu rappresentante l'area 5, e l'area 7 colorata in arancione; in B si nota l'idea di Vogt & Vogt (1919) secondo cui l'intero SPL fosse occupato da area 5 di Brodmann (adattata da Gamberini et al., 2020).

Secondo i più recenti studi citoarchitettureali, si è proposta l'ulteriore suddivisione della parte anteriore dell'SPL, caratterizzata da una regione corticale somatosensoriale, nelle tre regioni funzionali PE, PEci e PEip. La parte posteriore dell'SPL, invece, costituita da una regione bimodale visuo-motoria, è stata suddivisa nelle aree PEc, MIP, PGm e V6A (Seltzer & Pandya, 1986). Tra queste, le aree più studiate nel laboratorio dove è stato svolto il lavoro di tesi e da cui sono stati estratti ed elaborati i dati sono V6A, PE, PEc (Fig.6).

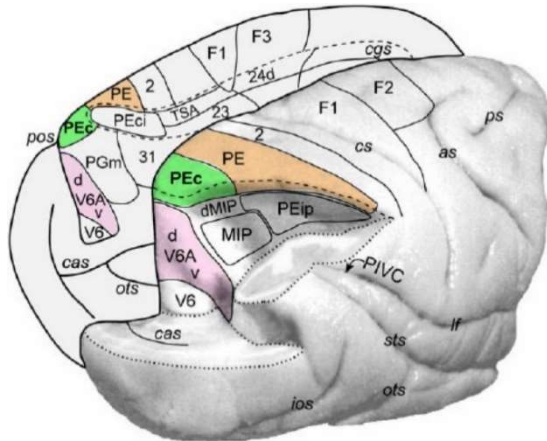


Figura 6 Rappresentazione laterale e mediale dell'SPL del cervello di Macaco. Sono evidenziate le aree PE, PEc e V6A (adattata da Bakola et al., 2010).

1.3.1. L'area PE

Ogni area del SPL è collegata a un insieme di aree parietali e premotorie coinvolte in specifici ruoli funzionali. Le principali afferenze corticali dell'area PE sono le corteccie somatosensoriali e motorie primarie. PE riceve input dalle regioni corticali motorie e premotorie che rappresentano principalmente gli arti superiori e, in piccola parte, quelli inferiori. Riceve, inoltre, anche input somatosensoriali/somatomotori dalle corteccie parietali (PEc, PEci, MIP, PEip), cingolate (aree 23 e 24) e input premotori da F3 (SMA, area motoria supplementare) (Fig.7) (Gamberini et al., 2020; Bakola et al., 2013).

PE dunque sembrerebbe coinvolta nel ruolo principale di integrazione sensoriale e motoria per il controllo principalmente degli arti superiori; in particolare risulterebbe responsabile dell'elaborazione motoria di informazioni sulla profondità e sulla direzione durante il raggiungimento, informazioni che sono trattate in modo separato e distinto (De Vitis et al., 2019).

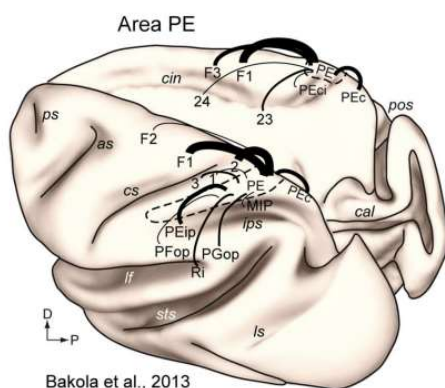


Figura 7 Principali connessioni cortico-corticali dell'area PE (da Bakola et al., 2013).

1.3.2. L'area PEc

L'area PEc si trova in una regione più caudale rispetto a PE. Essa condivide diverse connessioni corticali con PE, ma presenta importanti differenze rispetto ad essa. Riguardo agli input somatosensoriali e motori, PEc ne riceve uno molto debole da F1 (M1, corteccia motoria prima), e uno più intenso dall'area premotoria F2, in contrasto con PE (Bakola et al., 2010). Inoltre, PEc riceve afferenze dalle aree parietali (aree PE, MIP, PG, PGop) e mesiali (aree PECi, 23, 24, 31) correlate al somatosensoriale che sono piuttosto diverse rispetto a quelle di PE. Infine, PEc riceve un input dall'area visuomotoria V6A, che non è connessa con PE (Fig.8). Infine, mentre sia PE che PEc ricevono segnali motori relativi ai movimenti degli arti, PEc è più fortemente connessa con i settori della corteccia motoria e premotoria, rappresentanti gli arti inferiori rispetto a quelli che rappresentano gli arti superiori. Inoltre, mentre PE riceve solo informazioni somatiche, PEc riceve sia informazioni somatiche che visive (da V6A), riflettendo le differenze funzionali tra le due aree (Gamberini et al., 2020).

PEc, dunque, è un'area che ospita una rappresentazione del campo visivo, assieme a una mappa somatosensoriale incompleta e, di conseguenza, sembrerebbe contribuire alla guida visiva del comportamento motorio e alla coordinazione occhio-mano. Inoltre, tale area riceve principalmente informazioni dal campo visivo inferiore, ed è quindi coinvolto nella guida visiva alla locomozione (Gamberini et al., 2020).

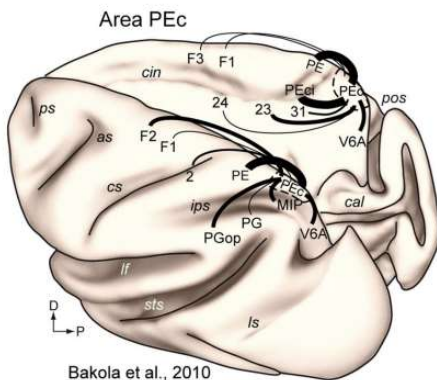


Figura 8 Principali connessioni cortico-corticali dell'area PEc (da Bakola et al., 2010).

1.3.3. L'area V6A

L'area V6A è la porzione caudale più estrema del SPL. Si tratta di un'area parietale relativamente ampia che si estende verso la superficie mesiale dell'emisfero, dove confina con PGm, e verso la superficie laterale dell'emisfero dove confina con l'area MIP. V6A mostra connessioni con le aree premotorie dorsali F2 e F7, oltre che con le aree extrastriate del lobo occipitale (V2,V3,V4, MST e V6). Potrebbe inoltre ricevere input somatosensoriali e somatomotori da PEc e MIP (Fig.9). Sia V6A che PEc ricevono proiezioni dall'area premotoria F2, rappresentante l'arto superiore, tuttavia mentre la seconda è connessa principalmente con aree corticali che rispondono a stimoli somatici, V6A mostra una preferenza per le aree dominate dalla codifica di stimoli visivi.

Infine, mentre in PE i segnali direzionali e di profondità sono codificati separatamente, in V6A tali informazioni vengono elaborate assieme (De Vitis et al., 2019).

V6A, quindi, sembrerebbe coinvolta nell'analisi visiva e nel controllo di tutte le fasi della prensione durante le azioni di raggiungi-e-afferra. Un ulteriore supporto ai suoi ruoli funzionali viene dalla presenza in V6A di neuroni che rispondono durante i movimenti oculari codificandone la loro direzione (Gamberini et al., 2020).

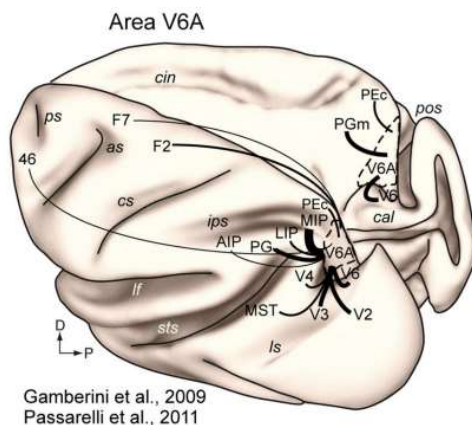


Figura 9 Principali connessioni cortico-corticali dell'area V6A (da Gamberini et al., 2009; Passarelli et al., 2011).

2. SCOPO DELLA TESI

Secondo Gamberini (2020), dunque, le aree PE, PEip e PEci sono aree somatomotorie che non sono influenzate da segnali visivi, mentre PEC, MIP, PGM e V6A sono aree bimodali influenzate da segnali somatomotori e visuomotori. Poiché si è dimostrato che l'area 5 di Brodmann è una regione corticale somatomotoria non influenzata dalla stimolazione visiva e l'area 7 di Brodmann, una regione somatomotoria/visuomotrice bimodale (Gamberini et al., 2020), dalle registrazioni di singole cellule nei macachi si suggerisce che in SPL, le aree somatomotorie siano parti dell'area 5 di Brodmann e le aree bimodali parti dell'area 7 di Brodmann. Ne risulta quindi che umani e macachi abbiano un'organizzazione dell'SPL molto simile, e che l'attivazione per movimenti di raggiungimento, sia di arto superiore che inferiore ricordino le proprietà funzionali dell'omologa regione in entrambi gli individui. Se SPL di umano e di macaco sono entrambi coinvolti nel controllo dei movimenti di allungamento delle braccia e di presa, allora si potrebbe utilizzare l'enorme quantità di dati raccolti da singole cellule di diverse aree del SPL del macaco per verificare la loro corrispondenza nella codifica di azioni raggiungi-e-afferra nell'uomo; in questo modo si potrebbe decidere se e come utilizzare i segnali neurali provenienti da SPL per guidare le braccia artificiali in pazienti tetraplegici. A tal fine, la seguente tesi si prefigge come scopo l'elaborazione dei dati raccolti dalle relative registrazioni attraverso l'archiviazione organizzata e facilmente accessibile sfruttando il formato HDF5. L'obiettivo è quello di rendere più semplice l'accessibilità a tali dati, in modo da contribuire alla ricerca volta allo sviluppo e all'ottimizzazione della progettazione di interfacce uomo-macchina, al ripristino del movimento in pazienti tetraplegici e alla riduzione di sperimentazioni animali non necessarie. La tesi si avvale, infine, di script in MATLAB per valutare la qualità di questi dati mediante l'analisi del movimento dell'occhio durante l'esecuzione dei vari compiti, e attraverso lo studio dell'intervallo di tempo tra due picchi successivi di attività elettrica generati da ogni neurone.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Implicazioni etiche

Tutte le procedure eseguite in questo studio sono conformi agli standard etici dell'Università di Bologna. Lo studio è stato condotto in conformità con le linee guida delle Direttive dell'UE (86/609/CEE; 2010/63/UE) e le leggi nazionali italiane (D.L. 116-92, D.L. 26-2014) sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. I protocolli sono stati approvati dal Comitato per il Benessere Animale dell'Università di Bologna e dal Ministero della Salute, come richiesto dal D.L. 26-2014, con i permessi numero N° 170/2015-PR, del 19/03/2015 e N° 389/2019-PR, del 20/05/2019.

Gli animali sono stati alloggiati in coppia presso uno stabulario per animali conforme alle normative italiane ed europee applicabili. L'installazione ha fornito agli animali sia luce naturale che artificiale e arricchimenti, inclusi piattaforme ricreative e frutta fresca. Durante lo studio, la salute e il benessere comportamentale degli animali sono stati attentamente monitorati da veterinari dedicati, e ricercatori certificati FELASA, specializzati nel lavoro con primati non umani.

La ricerca sui primati non umani è una parte piccola ma essenziale della ricerca neuroscientifica. I ricercatori coinvolti in questo studio riconoscono la loro responsabilità di condurre ricerca di alta qualità riducendo al minimo qualsiasi disagio o stress provato dagli animali. La condivisione dei dati dello studio in un formato standard a libero accesso contribuisce a questo impegno. Promuove trasparenza, accessibilità e utilizzo ottimale dei dati, conformandosi ai principi delle 3Rs e supportando gli sforzi internazionali per migliorare la segnalazione e l'accessibilità dei dati della ricerca biomedica.

Entrambi gli animali erano macachi maschi dalla coda lunga (*Macaca fascicularis*). L'animale S aveva tra i 4 e i 6 anni e pesava tra i 3,9 e i 4,9 kg durante il periodo sperimentale; l'animale F aveva tra i 5 e gli 8 anni e pesava tra i 3,7 e i 4,0 kg. Sono stati addestrati a eseguire dei compiti di raggiungimento con ritardo (vedi paragrafo 3.2 "Sessioni di registrazione"). Nella prima fase di addestramento, sono stati abituati a sedersi su una sedia per primati. Successivamente, gli animali sono stati portati in laboratorio per iniziare l'addestramento specifico per i diversi compiti. Le sessioni di addestramento sono iniziate con versioni semplificate dei compiti e sono progredite gradualmente fino a quando è stato appreso l'intero compito. La fase di addestramento è stata considerata completata quando le scimmie hanno raggiunto una prestazione accettabile. Le chirurgie sono state eseguite in modo asettico utilizzando tecniche standard, inclusa un'adeguata analgesia perioperatoria e monitoraggio per ridurre al minimo il potenziale dolore. Prima dell'intervento chirurgico, gli animali sono stati sedati con cloridrato di ketamina e quindi anestetizzati con pentobarbital sodico per impiantare il supporto per la testa e la camera di registrazione. È stato effettuato

un monitoraggio della frequenza cardiaca, della frequenza respiratoria e della temperatura corporea. Quest'ultima è stata stabilizzata con un tappetino riscaldante.

È stato eseguito l'impianto di una camera di registrazione al livello delle aree cerebrali V6A, PE e PEc. Durante le sedute sperimentali, per la registrazione dell'attività elettrica delle singole cellule, è stato utilizzato un sistema di registrazione a 5 canali (*Thomas Recording*). I potenziali d'azione, infine, sono stati amplificati e filtrati. Infine, è stato utilizzato un discriminatore di forme d'onda (*Multi Spike Detector; Alpha Omega Engineering*) che ha permesso l'isolamento dei potenziali di azione in ciascun canale. Lo staff della clinica veterinaria dell'Università di Bologna e i neurochirurghi dell'Ospedale Neurologico Bellaria hanno contribuito alle operazioni di chirurgia.

3.2. Sessioni di registrazione

La registrazione dei segnali elettrofisiologici è avvenuta mentre gli animali eseguivano i vari compiti al buio, con la testa vincolata, utilizzando la mano controlaterale all'emisfero di registrazione. Il macaco era posizionato su una sedia appositamente progettata per primati, costituita da una piattaforma posta tra testa e busto che limitava la visibilità delle braccia dell'animale. Di fronte a esso era presente uno specchio che consentiva al sistema di tracciamento oculare di registrare il movimento degli occhi (oculometro a infrarossi ISCAN ETL200). Inoltre, era presente un sistema di ricompensa costituito da un cilindro graduato contenente acqua, connesso a una valvola a solenoide che azionava il rilascio del liquido all'interno di una cannuccia attraverso la quale, in caso di completamento del compito, veniva erogata la ricompensa. L'ammontare di acqua data all'animale dopo ogni prova corretta era impostato in modo tale da soddisfare i requisiti nutritivi giornalieri (*Fig.10*).

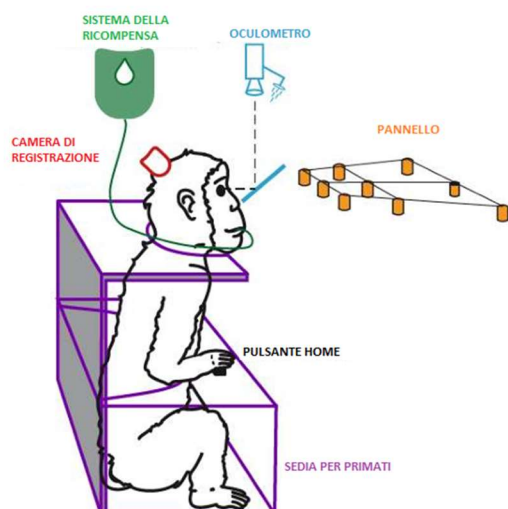


Figura 10 Apparato sperimentale. Da notare in viola la sedia per primati, in nero il pulsante Home necessario per segnalare la posizione iniziale per i movimenti di raggiungimento, in rosso la camera di registrazione, in azzurro l'oculometro, in giallo il pannello contenente i LED, in verde il sistema della ricompensa. (adattata da Diomedes et al., 2024).

Come mostrato nella Fig.11A, i movimenti di raggiungimento partivano da un pulsante (PULSANTE HOME) posizionato vicino al petto dell'animale (a 4 cm da esso), sulla linea mediana sagittale e fuori dal campo visivo dell'animale. L'animale raggiungeva 9 diodi a emissione di luce (LED) posizionati al livello degli occhi, a tre diverse distanze e in tre diverse direzioni (Fig.11). Tre bersagli LED erano posizionati a tre angoli di iso-versione: i bersagli più vicini erano situati a 10 cm dagli occhi (17.1° di vergenza) e i LED posizionati in posizioni intermedie e lontane erano a una profondità rispettivamente di 15 cm (11.4°) e 25 cm (6.9°). Per ogni angolo di iso-versione i LED erano posizionati in tre direzioni: uno centrale, lungo la linea mediana sagittale e 2 laterali, sinistra e destra, rispettivamente ad angoli di iso-versione di -15° e $+15^\circ$. Le posizioni dei bersagli sono state selezionate in modo che fossero tutte all'interno dello spazio peripersonale dell'animale.

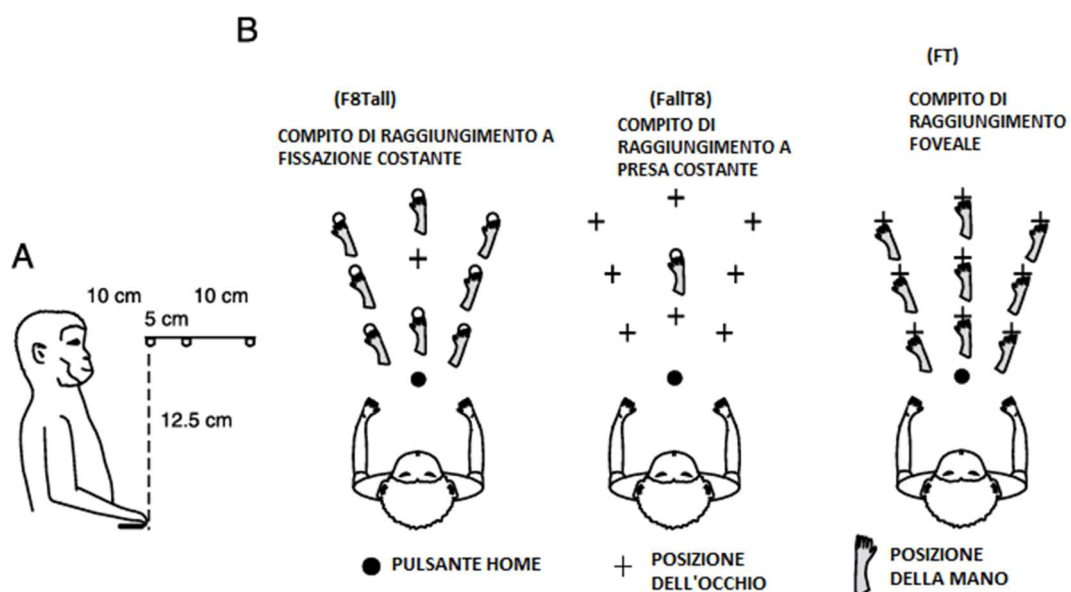


Figura 11 Configurazione sperimentale e sequenza delle attività da svolgere durante i vari compiti. (A) Vista laterale della configurazione in riferimento alla profondità dei vari obiettivi. (B) Vista aerea delle tre configurazioni di compito che l'animale avrebbe dovuto eseguire; da notare le tre direzioni (sinistra, centrale, destra) dei vari obiettivi. I tre compiti sono: raggiungimento a fissazione costante, in cui l'animale deve fissare un punto fisso centrale e andare a raggiungere col braccio una delle 9 posizioni (indicato con la sigla F8Tall); raggiungimento a presa costante, in cui l'animale deve effettuare la prensione del bersaglio centrale e fissare uno dei 9 punti (indicato con la sigla FallT8); raggiungimento foveale, in cui l'animale deve fissare e andare a raggiungere il medesimo bersaglio (indicato con la sigla FT) (adattato da Bosco et al., 2016).

La sequenza temporale del compito è mostrata in Fig.12. Un trial iniziava quando l'animale premeva il pulsante (pressione pulsante HOME). L'animale poteva guardarsi attorno e non era tenuto a eseguire immediatamente alcun movimento degli occhi o del braccio. Dopo 1000 ms, il LED del bersaglio da fissare si accendeva (*Green on*), segnalando all'animale di spostare lo sguardo su di esso e di mantenere premuto il pulsante mentre attendeva il segnale successivo. Passati 700ms dal momento della fissazione (*Fix on*), veniva illuminato un LED giallo (*Flash on* e *Flash off*) per 150 ms in una delle 9 posizioni, indicando il bersaglio per il movimento di raggiungimento. L'animale doveva quindi attendere ulteriori 1000-1500 ms per un cambio di

colore del LED di fissazione (da verde a rosso, *Green to red*) senza eseguire alcun movimento degli occhi o del braccio. Il cambio di colore del bersaglio di fissazione era il segnale di partenza per l'animale di rilasciare il pulsante HOME e, mantenendo la fissazione sul bersaglio rosso, eseguire un movimento del braccio verso il bersaglio di raggiungimento e premerlo. L'animale manteneva la mano sul bersaglio di raggiungimento fino allo spegnimento del LED di fissazione (*Red off*) (dopo 800-1200 ms). Lo spegnimento del LED di fissazione informava l'animale di rilasciare il bersaglio di raggiungimento e di premere nuovamente il pulsante HOME per terminare la prova, essere ricompensato e prepararsi a iniziare la successiva.

Il compito prevedeva 3 varianti presentate a blocchi. All'interno di ogni blocco si avevano 10 ripetizioni per ogni combinazione di fissazione/bersaglio (9) proposte in modo casuale (90 ripetizioni corrette per ogni blocco).

Nel primo blocco, il movimento di raggiungimento veniva eseguito mantenendo la fissazione dello sguardo nella posizione centrale (*Fig.11B*, F8Tall). Mantenere costante il punto di fissazione consentiva di escludere le risposte delle cellule risultanti dai segnali di vergenza e versione degli occhi.

Il secondo blocco consisteva in una variante del compito in cui il bersaglio del raggiungimento era costantemente situato in una posizione centrale (*Fig.11B*, FallT8) mentre il punto di fissazione variava in una delle 9 posizioni. Mantenere costante il bersaglio di raggiungimento consentiva di mantenere costanti la distanza e la direzione dei movimenti di raggiungimento e quindi escludere le risposte delle cellule influenzate dalla distanza e dalla direzione del movimento del braccio. Questa condizione ha permesso di studiare le coordinate occhio-bersaglio relative al bersaglio da fissare, mantenendo costante la posizione spaziale del bersaglio di raggiungimento.

L'ultimo blocco prevedeva un raggiungimento "foveato" (*Fig.11B*, FT). Qui, il bersaglio di fissazione era sempre coincidente con il bersaglio di raggiungimento. Poiché i movimenti di raggiungimento sono sempre diretti verso bersagli da fissare, le coordinate occhio-bersaglio rispetto a quelle del bersaglio da raggiungere sono rimaste costanti durante tutto il compito, mentre sia la versione/vergenza degli occhi che la direzione/profondità del braccio cambiavano continuamente.

Per tutte e tre le varianti del compito, la sequenza temporale, la posizione dei LED e gli altri parametri sono esattamente gli stessi di quelli descritti in precedenza.

Una finestra elettronica obbligava le scimmie a fissare il LED dall'inizio (prima del segnale di partenza) fino al suo spegnimento (che segnalava il ritorno del raggiungimento). Le ripetizioni in cui la fissazione è stata interrotta durante questo intervallo sono state bloccate e scartate immediatamente. La corretta esecuzione dei movimenti di raggiungimento, invece, è stata rilevata tramite microinterruttori monopolari (*RS Components*, UK) montati sotto il pulsante HOME e sotto i bersagli di raggiungimento. Le pressioni/rilasci dei

pulsanti sono state registrate con risoluzione di 1 ms. La presentazione degli stimoli e le prestazioni dell'animale sono state monitorate utilizzando software personalizzati scritti in *LabView* (*National Instruments*) (Bosco et al., 2016).

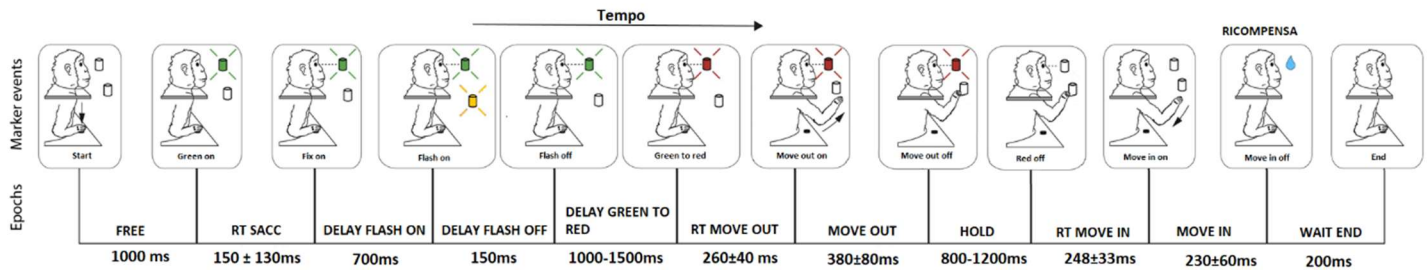


Figura 12 Sequenza temporale dei compiti. Da sinistra a destra sono mostrati gli eventi dei compiti: Start indica l'inizio della prova; Green on indica l'accensione di una luce di colore verde nel bersaglio da fissare; Fix on indica l'animale che inizia a fissare il bersaglio; Flash on e Flash off indicano il bersaglio su cui l'animale dovrà effettuare la presa; Green to red indica il cambio di colore del LED da fissare che passa dalla colorazione verde a quella rossa dando il segnale all'animale di avviare il movimento di raggiungimento; Move out on indica l'inizio del movimento dell'animale che smette di premere il pulsante HOME; Move out off indica il termine dell'azione di movimento dato che l'animale ha raggiunto il bersaglio; Red off indica lo spegnimento del LED di fissazione e dà il segnale all'animale di tornare in posizione di partenza; Move in on è l'inizio dell'azione di ritorno alla posizione di partenza; Move in off è il termine dell'azione di ritorno, momento in cui l'animale riceve la ricompensa; End segnala la fine della prova. Nell'immagine il bersaglio da fissare e quello su cui effettuare la presa sono indicati come LED su bersagli differenti per facilitarne la comprensione. Bisogna comunque considerare che dipende dal compito in via di esecuzione: nel caso del compito di raggiungimento foveale il bersaglio da raggiungere sarà lo stesso da fissare e sarà costituito due led, uno che ne indica la fissazione e uno che lampeggia di giallo e che ne indica la prensione (adattata da Diomedì et al., 2024).

3.3. Estrazione e preparazione dei dati

I dati ottenuti tramite sperimentazione su macaco sono stati memorizzati all'interno di un server del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna. A questo punto è stato necessario eseguire l'estrazione dei dati interessati in modo da poterli utilizzare per strutturare il file HDF5. Prima di procedere con tale operazione, è stata tuttavia necessaria una preliminare procedura di indicizzazione. A seguire si descrive il procedimento nel dettaglio.

3.3.1. Indicizzazione dell'estrazione

Prima di procedere con il processo di estrazione dei dati dal server, è stato necessario utilizzare diverse strategie mirate all'ottenimento degli indici identificativi necessari nel guidare lo script MATLAB durante tale processo: in particolare, il primo compito stato è quello di indicizzare le informazioni pertinenti ai dati da dover estrarre. Per fare ciò, si è lavorato su un database che conteneva una vasta gamma di informazioni su tutti i neuroni studiati nei vari esemplari di macaco nel corso degli anni, selezionando specificamente le cellule di una determinata zona cerebrale (V6A, PE o PEC) e testate con tutti e tre i compiti (F8Tall, FT e

In conclusione, la procedura di indicizzazione, ha permesso la preparazione di una tabella (*Fig.13*) contenente le informazioni riguardanti la cellula e i numeri identificativi di prova sperimentale e condizione in modo ordinato, garantendone la compatibilità con lo script MATLAB che si occupa dell'estrazione dei dati neurali veri e propri dal server.

Figura 13 Esempio di tabella rappresentante le cellule presenti nell'area PE, relative a uno dei tre compiti eseguiti dall'animale. Da notare le prime due celle contenenti elettrodo e numero di cellula registrata; le celle seguenti alternano codice identificativo della prova sperimentale e codice identificativo di ciascuno delle 9 condizioni.

Durante questa fase, si è proceduto all'estrazione dei dati utilizzando un ulteriore script MATLAB. L'algoritmo ha sfruttato i codici identificativi registrati sul file Excel, assegnati a ciascuna prova sperimentale e a ciascuna condizione per recuperare le informazioni pertinenti direttamente dal server. Tra queste informazioni vi erano le tempistiche di esecuzione degli eventi chiave descritti in *Fig.12* durante ogni prova sperimentale per ogni condizione che rappresentano il comportamento dell'animale. Oltre a questi, venivano estratte le

tempistiche di insorgenza dei potenziali d'azione relativi a ciascuna cellula durante ognuno di questi momenti.

Infine, lo script ha estratto i dati relativi al movimento degli occhi lungo gli assi x e y registrati dall'oculometro durante le prove. Questi dati sono fondamentali per comprendere l'interazione visuomotoria durante l'esecuzione dei compiti e confermare la validità delle informazioni sperimentali. Oltre ai dati sul movimento degli occhi, sono state recuperate anche le tempistiche relative a ognuna delle misurazioni dell'oculometro per permettere l'allineamento dei dati relativi alla posizione dello sguardo con quelli neurali e comportamentali.

L'utilizzo di un algoritmo automatizzato ha garantito un'efficiente estrazione dei dati, riducendo al minimo il rischio di errori e consentendo di ottenere un ampio volume di informazioni in modo rapido e accurato. Questi dati estratti rappresentano una risorsa preziosa per le analisi successive, consentendo di esaminare in dettaglio il comportamento dell'animale durante le prove sperimentali e correlarlo con l'attività corticale.

Una volta estratti, i dati sono stati organizzati e archiviati in un formato strutturato MATLAB (.mat) per agevolarne l'analisi. Questo processo di organizzazione è fondamentale per assicurare che i dati siano facilmente accessibili e interpretabili per gli studi successivi. La corretta gestione dei dati è cruciale per garantire la validità e l'affidabilità delle analisi condotte.

In conclusione, l'estrazione dei dati tramite l'algoritmo MATLAB costituisce una fase essenziale del processo e tali informazioni saranno un'importante base per la strutturazione del file HDF5, e per la successiva analisi del comportamento visuomotorio dell'animale e quindi della validità dei dati recuperati.

3.4. Organizzazione dei dati in formato HDF5

Durante la fase di creazione dei dataset in formato HDF5, è stato impiegato un ulteriore algoritmo per estrapolare e organizzare i dati precedentemente preparati. Questo algoritmo ha inserito i dati all'interno di una struttura più chiara e comprensibile all'utente finale. Le schermate rappresentanti la struttura dei vari dataset della seguente tesi sono state ottenute sfruttando il software HDFView 3.3.1. che permette, tramite un'interfaccia user-friendly, di facilitare l'accesso alle informazioni contenute in questi file. HDFview è stato sviluppato dall'HDF Group, un'associazione non-profit che ha inventato questo tipo di formato, ed è gratuitamente scaricabile dal loro sito ufficiale (The HDF5® Library & File Format - The HDF Group. <https://www.hdfgroup.org/solutions/hdf5/>).

I dataset generati al termine di questa procedura sono 6, ognuno dei quali con una struttura gerarchica identica: DATA/unit/Task/condition/trial/. Andando ad analizzare oggetto per oggetto si può dire che: l'*unità* si riferisce alla cellula di cui i dati fanno parte, e a questa cartella è associato un insieme di attributi, tra cui

"Cito" che indica l'area cerebrale di cui fa parte, "Electrode id" che identifica il codice della cellula, e "Hemisphere" che specifica l'emisfero della cellula (R per destro e L per sinistro).

Per ciascuna cellula, sono presenti poi sottocartelle indicate con la voce *Task* relative ai tre compiti analizzati F8Tall, FT e FallT8. Ad ogni compito si associano le rispettive sottocartelle *condition* che definiscono i 9 bersagli. Anche queste *condition* possiedono degli attributi. In particolare: "Target label" contiene le informazioni riguardanti la posizione di questi bersagli sul pannello, rispetto al punto di riferimento, che è l'animale, o più precisamente il pulsante HOME (rappresentato dal cerchio rosso in Fig.14) e sono specificate come 'near left', 'near central', 'near right', 'intermediate left', 'intermediate central', 'intermediate right', 'far left', 'far central', 'far right' (Fig.14); "Laterality" indica l'angolo tra l'asse frontale e il vettore che collega la posizione iniziale al bersaglio sul piano orizzontale; "Elevation" rappresenta l'angolo tra il piano orizzontale e il vettore che collega la posizione iniziale al bersaglio; "Distance" indica la distanza dal pulsante HOME; "3D cartesian coordinates" indicano le coordinate relative al sistema di riferimento centrato sempre sul pulsante HOME, con l'asse X per l'asse frontale, Y per l'asse sagittale e Z per l'asse verticale;

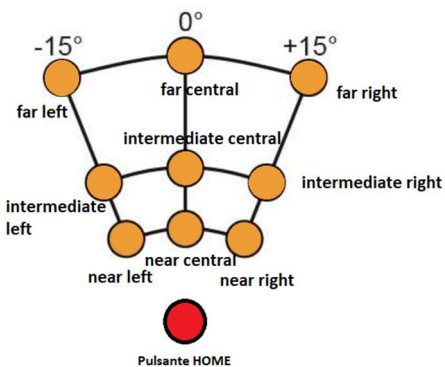


Figura 14 L'immagine mostra una rappresentazione con prospettiva aerea del pannello contenente i 9 bersagli, per dare un significato spaziale ai Target label associati a ogni relativo bersaglio. Inoltre, sono indicati anche i valori angolari relativi alla lateralità destra e sinistra dei vari bersagli (+15°, -15°). Infine, in rosso è rappresentato il punto di riferimento, ovvero il pulsante HOME (adattata da Diomedi et al., 2024).

All'interno delle *condition* si trovano i *trial*, ovvero le ripetizioni effettuate per quel determinato bersaglio di quel determinato compito per cui è stato analizzato il comportamento di quella cellula. Ogni prova sperimentale è caratterizzata da un attributo "Duration" che indica la durata in millisecondi, dalla prima pressione del pulsante HOME (che segna l'inizio della prova sperimentale) fino alla seconda (che segna la fine della prova sperimentale) (come illustrato in Fig.12).

Infine, all'interno della cartella *trial* sono presenti le informazioni dettagliate suddivise in tre oggetti: *spike_trains*, *event_markers*, *tbeyes* e due sottocartelle, *Left Eye* e *Right Eye*. *Spike_trains* contiene i dati relativi alle tempistiche in ms dei potenziali d'azione registrati durante la prova. Ad esso è stato assegnato l'attributo "number of spikes", il quale indica il numero totale di potenziali d'azione registrati.

D'altra parte, l'oggetto *event_markers* contiene i valori temporali di ciascuno dei 12 eventi che caratterizzano la prova sperimentale. A tale oggetto è inoltre associato l'attributo "Marker labels" che indica la natura dei valori temporali contenuti all'interno di *event_markers*, tra cui: 'Start', 'Green on', 'Fix on', 'Flash on', 'Flash

off', 'Green to red', 'Move out on', 'Move out off', 'Red off', 'Move in on', 'Move in off', 'End' (che sono corrispettivi agli eventi illustrati in Fig.12). Per quanto riguarda *Right Eye* e *Left Eye*, sono due sottocartelle che contengono al loro interno gli oggetti X ed Y, che rappresentano i valori registrati dall'oculometro sull'asse X e sull'asse Y rispettivamente dell'occhio destro e sinistro. *Tbeyes*, infine, è l'oggetto che contiene i valori temporali (definiti *timestamps*) di ciascun valore spaziale relativo al movimento degli occhi.

3.5. Processo di analisi dati

L'ultima parte della procedura ha compreso una valutazione analitica qualitativa e quantitativa dei dati appena organizzati. In particolare, la qualità dei dati è stata verificata quantitativamente attraverso l'analisi dell'ISI (Interspike Interval) e qualitativamente attraverso due valutazioni: una del movimento oculare e un'altra relativa all'attività neurale sfruttando un metodo di visualizzazione definito Raster Plot.

In ogni caso, per svolgere tali analisi, si è sfruttato uno dei principali vantaggi dei file HDF5, ovvero la compatibilità con MATLAB. Tramite l'utilizzo di appositi script in grado di estrarre le informazioni di interesse contenute nei file, si sono potuti eseguire i calcoli necessari, e generare grafici fondamentali per questo processo di analisi.

3.5.1. Raster Plot

Un Raster Plot consiste in una valutazione del coinvolgimento dell'attività neurale durante i 12 eventi che caratterizzano la prova sperimentale, tramite la sovrapposizione dei marcatori dei 12 eventi ai vari potenziali d'azione registrati durante le prove sperimentali. Ad esempio, l'evento "Fix on" indica il momento in cui il soggetto inizia a fissare il bersaglio: le linee nere vicine a quel punto rappresentano i potenziali d'azione neurali registrati nel periodo peri-saccadico. Un'elevata ricorrenza di potenziali durante quella fase indica che, molto probabilmente, quella cellula sia correlata a quella determinata azione specifica in quella fase sperimentale, per quel particolare compito.

D'altro canto, se durante quell'evento, invece, non si osserva una particolare preponderanza di potenziali, significa che quella particolare cellula potrebbe non essere correlata a quell'operazione di movimento del braccio, di fissaggio o di prensione.

Nel caso di una valutazione che comprenda l'utilizzo dei dati di molteplici condizioni è possibile poi analizzare se una cellula sia correlata ad, esempio, a un determinato movimento del braccio a prescindere della posizione spaziale del bersaglio o se la diversa posizione spaziale possa essere influente nell'attivazione di un'eventuale altra via funzionale costituita da una rete neurale che non coinvolga quello specifico neurone. Una stessa cellula, infatti, può essere correlata a più funzioni, e piccole variazioni della medesima funzione (come una diversa posizione nello spazio del bersaglio rispetto al piano di riferimento corporeo) possono

coinvolgere reti neurali diverse, di cui quello specifico neurone potrebbe non far parte (Galletti & Fattori, 2018).

La scelta dell'animale (F o S), dell'area (PE, P_{Ec} o V6A) e del compito di cui si vuole effettuare l'analisi (FT, F8Tall o FallT8) è facilmente selezionabile dall'utente direttamente dalla console di MATLAB. È possibile anche variare il gruppo d'indagine, (analizzare i dati di raggiungimento per un singolo bersaglio, o per tutti i bersagli contemporaneamente) andando ad effettuare semplici e intuitive modifiche al livello del codice dello script.

Infine, si è scelto di visualizzare l'attività neurale attraverso il cosiddetto 'Peri Stimulus Time Histogram (PSTH)', molto usato nell'ambito dell'elettrofisiologia. Tale tecnica consiste nella rappresentazione del numero di potenziali d'azione sottoforma di istogramma allineato ad un evento di interesse dell'esperimento per valutare le variazioni nell'attività di scarica precedenti o successive a tale evento. La funzione divide l'intervallo di registrazione di ogni ripetizione del compito (centrato sull'evento 'Move out on'), che va -4000ms a 3000ms, in "*bin*" ovvero sottointervalli di 10ms. Dopodiché, l'algoritmo calcola quante volte ciascun potenziale di azione cade all'interno di ciascun *bin* e lo rappresenta in un istogramma, che riporta sull'asse delle Y il numero di potenziali e nell'asse delle X l'intervallo temporale dell'intera registrazione analizzata. La funzione è integrata nello script del Raster Plot e la generazione del grafico PSTH viene svolta in automatico per i medesimi dati selezionati.

3.5.2. Interspike Interval

L'Interspike Interval (ISI) rappresenta la distanza temporale tra due potenziali d'azione consecutivi e, generalmente, è utilizzato per valutare se la registrazione effettuata riguardi un singolo neurone o se nella registrazione compaiano interferenze dovute a combinazioni di neuroni che scaricano in modo variabile o ad altri fattori di disturbo. Si parte dall'assunzione che un neurone fisiologicamente non depolarizzi più di una volta ogni 2-3 millisecondi. Considerando che la depolarizzazione dura circa 1-1,5 millisecondi e che vi sia un periodo refrattario di almeno 1-2 millisecondi prima del successivo potenziale, ci si aspetta che un ISI accettabile per una buona risoluzione della registrazione debba essere di almeno 1 millisecondo o più.

Considerando questo comportamento fisiologico, dati neurali con ISI che violino frequentemente questo limite, potrebbero essere indice della presenza di due o più cellule separate che vengono erroneamente considerate come un unico neurone, o ancora potrebbero trattarsi di altri tipi di interferenze in grado di compromettere la qualità di tali dati.

L'analisi degli ISI viene solitamente eseguita per singola cellula al fine di valutare la validità dei dati specifici per quella cellula. Se la percentuale di violazioni del periodo refrattario è bassa, i dati sono considerabili di ottima qualità e di conseguenza affidabili.

È possibile, però, effettuare un'analisi degli ISI anche per interi set di dati. Nel caso in questione, è utile farlo, per avere un'idea generale della qualità dei dati appartenenti alle registrazioni dei potenziali d'azione di tutte le cellule di quella determinata area cerebrale registrate durante l'esecuzione di quello specifico compito. Come nel caso dei grafici Raster, anche lo script sviluppato per questa analisi permette una grande personalizzazione da parte dell'utente, potendo scegliere animale, area, compito e cellula su cui si ha intenzione di effettuare l'analisi.

3.5.3. Movimento degli occhi

L'analisi del movimento dell'occhio riveste un ruolo cruciale nello studio del comportamento animale e nell'interpretazione dei dati sperimentali. Il movimento oculare, innanzitutto, fornisce preziose informazioni sulla percezione visiva, l'attenzione e l'intenzione di compiere determinate azioni durante la sperimentazione (Galletti & Fattori, 2018).

In secondo luogo, questo aspetto è cruciale per valutare l'attività neurale correlata al sistema visivo, come ad esempio determinare quale delle tre aree è maggiormente coinvolta nella processazione dei movimenti oculari in base alla corrispondenza di una maggiore frequenza dei potenziali d'azione (indice di una maggiore attività di quelle particolari cellule facenti parte di quell'area cerebrale), sovrapponendo tali informazioni anche agli eventuali effetti che possono derivare dall'esecuzione di compiti diversificati, come il raggiungimento a fissazione costante, il raggiungimento a presa costante e il raggiungimento foveale.

Infine, monitorare attentamente il movimento degli occhi durante le fasi sperimentali è essenziale per garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti. Qualsiasi deviazione dai pattern attesi di fissazione visiva potrebbe indicare una compromissione della validità della prova, richiedendo un'attenta valutazione e, se necessario, l'adozione di misure correttive. In questo ultimo caso, prima dell'evento Fix On, all'animale era permesso compiere saccadi per esplorare lo spazio circostante senza invalidare la prova. Dopo di ciò inizia la fase di fissazione, per cui per una prova valida è necessario che l'animale non sposti il suo sguardo durante l'intero processo e che il grafico a linee mostri un andamento piatto.

In modo analogo a quanto detto nel caso dei grafici Raster e ISI, anche lo script per lo studio del movimento degli occhi presenta la medesima caratteristica di personalizzazione da parte dell'utente permettendogli di scegliere l'analisi su quale area, cellula, animale o compito differente debba essere effettuata.

4. RISULTATI

Al termine dell'attività sono stati ottenuti un totale di 6 file HDF5, strutturati secondo l'organizzazione specificata al paragrafo 3.4 (Fig.15). In particolare, si hanno 3 file relativi all'animale F, e 3 file relativi all'animale S. Riguardo ciascun soggetto si hanno le informazioni relative alle 3 aree, PE, PEc e V6A catalogate ciascuna in un proprio file (Tabella 1), all'interno di ognuno dei quali ci sono le informazioni registrate durante i 3 compiti di raggiungimento foveale, raggiungimento a fissazione costante e raggiungimento a presa costante. Ogni popolazione neurale conta un diverso numero di cellule registrate durante le varie sessioni, come riportato in Tabella 1.

	DIMENSIONE	NUMERO DI CELLULE
F. PE	111 MB (116.856.466 byte)	14
F. PEc	560 MB (587.687.678 byte)	64
F. V6A	453 MB (475.138.840 byte)	54
S. PE	351 MB (368.540.552 byte)	40
S. PEc	527 MB (553.642.718 byte)	61
S. V6A	915 MB (960.092.678 byte)	106

Tabella 1 La tabella mostra le dimensioni in MB dei 6 file HDF5 risultanti, e per ognuno di essi, il numero di cellule di quella specifica area cerebrale di cui sono contenuti i dati.

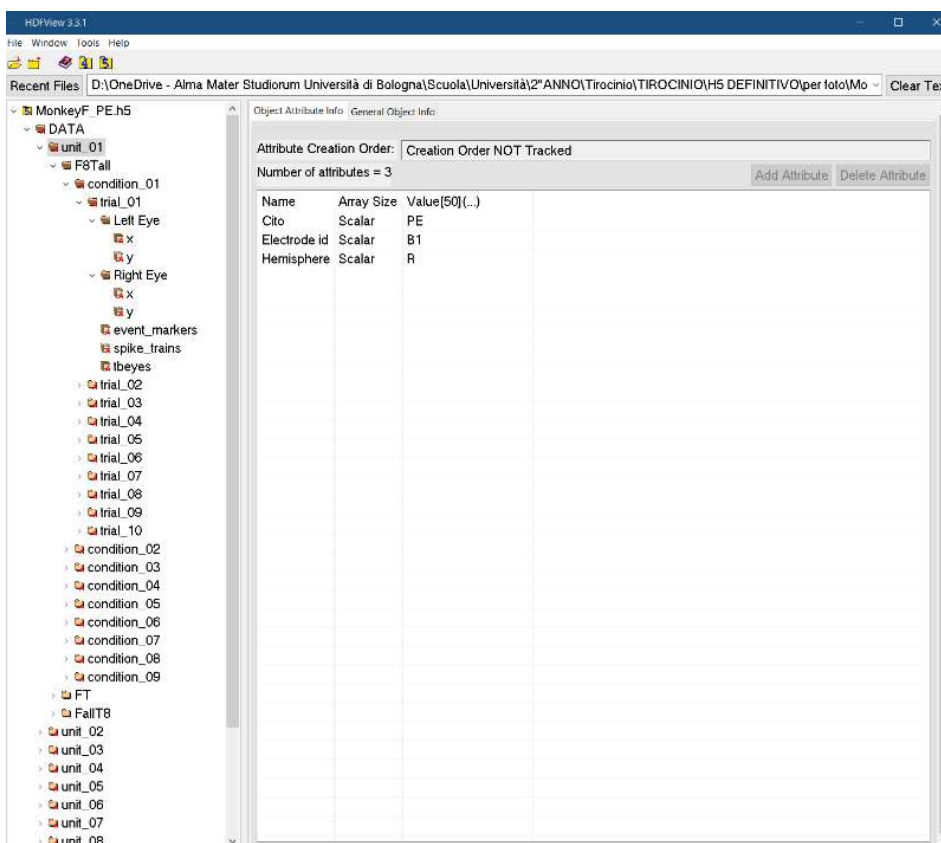


Figura 15 Visualizzazione della struttura gerarchica del file HDF5 inerente all'area PE dell'animale F tramite il software HDFView 3.3.1. A sinistra si può osservare l'organizzazione gerarchica in gruppi, sottogruppi e dataset. A destra, invece si possono visualizzare le informazioni relative agli attributi associati a ciascuna cartella o oggetto.

4.1. Analisi attraverso Raster Plot

L'insorgenza dei potenziali d'azione di un neurone d'esempio appartenente all'area V6A può essere valutato graficamente grazie al Raster Plot (Fig.16). L'attività può essere correlata al comportamento dell'animale durante le varie ripetizioni del compito visualizzandone allo stesso tempo i marcatori registrati insieme ai dati neurali. A questo proposito, nella figura si vedono durate fisse per alcuni intervalli temporali come quella tra i marker di *start* e *green on*, che sono fissati dallo sperimentatore; altri intervalli, invece, risultano variabili tra un trial e l'altro, perché dipendono dal comportamento dell'animale, come il movimento in direzione del bersaglio (tra i marker *move out on* e *move out off*) e ancor di più nel caso del movimento di ritorno (tra i marker *move in on* e *move in off*). Per quanto riguarda l'attività di scarica del neurone d'esempio, è possibile notare come la maggioranza delle depolarizzazioni si verifichino durante le prime fasi dello svolgimento del compito, deputate principalmente alla fase visiva di fissazione e di individuazione del bersaglio per la presa, con un picco di attività (Fig.16B) nell'intervallo temporale tra *fix on* e *move out on*. Si vede una notevole inibizione anche durante l'inizio del movimento che persiste durante la fase di trattenuta del LED. Si ha, infatti, una completa assenza di potenziali d'azione registrati tra le epoche temporali *move out on* e *move out off*, ovvero durante il movimento di andata verso il bersaglio. Inoltre, durante le fasi successive, in particolar modo a seguito dello spegnimento della luce rossa, la cellula mostra un'eccitazione decrescente, probabilmente a causa dell'assenza di un input visivo per l'animale (è importante ricordare che le varie prove sperimentali si svolgono in condizioni di oscurità totale e che dopo lo spegnimento della luce rossa l'ambiente ritorna completamente buio). Sapendo a priori come V6A sia coinvolta nell'analisi visiva e nel controllo di tutte le fasi della prensione durante le azioni di raggiungi-e-afferra (Gamberini et al., 2020), si può dire che la cellula d'esempio appartenente all'area in questione, rispecchi perfettamente tale profilo. Queste incidenze mostrano, quindi, come la cellula, sia più attiva durante gli input visuomotori, con un picco durante la fase in cui l'animale valuta il bersaglio verso cui effettuare il movimento, e mostri una minore attività nelle fasi esclusivamente motorie prive di input visivi. Infine, è bene precisare che la figura 16 mostra l'analisi di tutti i potenziali d'azione registrati durante l'esecuzione del compito F8Tall senza discriminarli per posizione spaziale del bersaglio; dunque, non fornisce informazioni riguardo a eventuali variazioni che potrebbero derivare da tale variabile. In ogni modo, tale studio, risulta comunque utile poiché dà un'idea di come le registrazioni dei potenziali siano coerenti con la teoria, e qualitativamente attendibili.

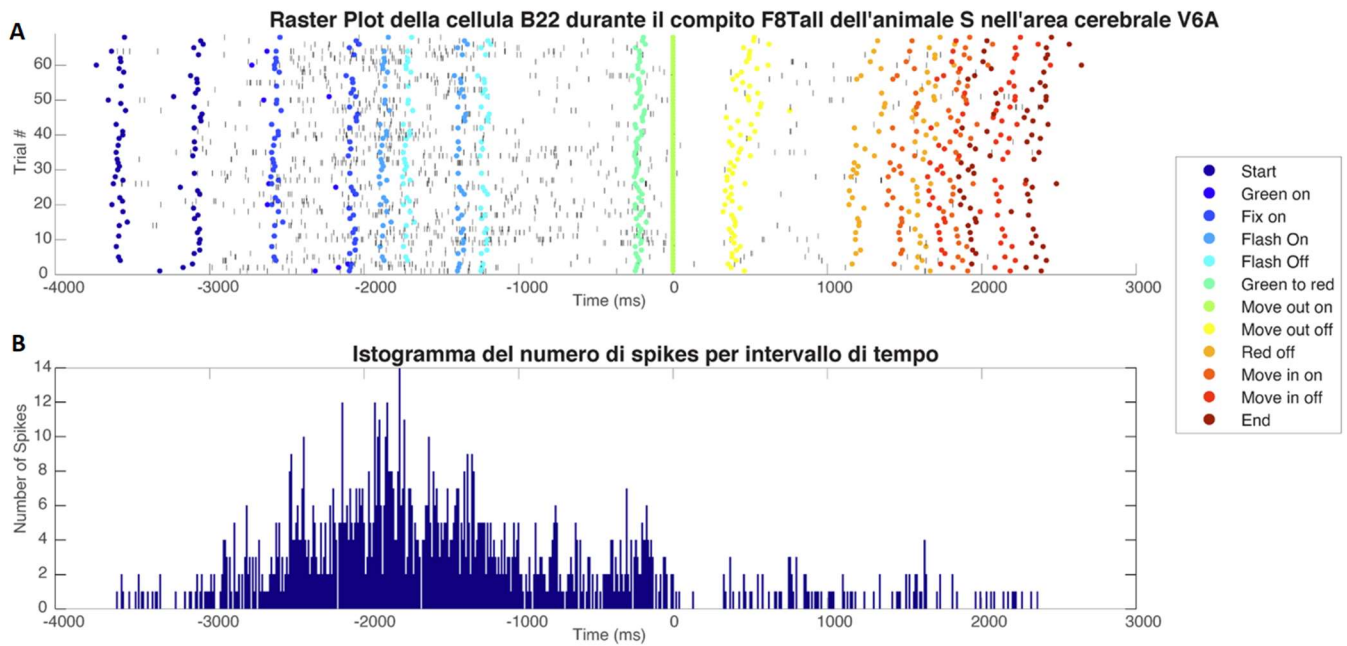


Figura 16 In A si ha l'immagine del Raster Plot generato tramite l'apposito script MATLAB. Il grafico riporta i potenziali registrati della cellula B22 dell'area V6A dell'animale S, durante l'esecuzione del compito di raggiungimento a fissazione costante. Ogni riga corrisponde ad una ripetizione del compito (trial), mentre sull'asse delle ascisse si ha il tempo in ms. I punti colorati rappresentano i 12 eventi comportamentali che si hanno durante la prova, mentre le linee nere rappresentano i potenziali d'azione registrati. In B, invece, si ha il PSTH della medesima cellula che consente una rappresentazione semplificata del numero di potenziali registrati in funzione del tempo (ms) con un picco nell'intervallo temporale tra i marker *fix on* e *move out on*.

4.2. Analisi attraverso Interspike Interval

Vista l'enorme mole di informazioni è stato opportuno effettuare una valutazione quantitativa della qualità dei dati di registrazione attraverso lo studio delle violazioni dell'ISI (vedi paragrafo 3.5.2 "Interspike Interval"): si sono ottenuti, così, due istogrammi d'esempio che riportano rispettivamente i valori di ISI per una cellula singola (Fig.17A) e per un intero dataset (Fig.17B). Quando l'ISI è inferiore a 1ms si considera dovuto a fenomeni elettrici non fisiologici, essendo impossibile per un neurone singolo depolarizzarsi nuovamente nel periodo refrattario.

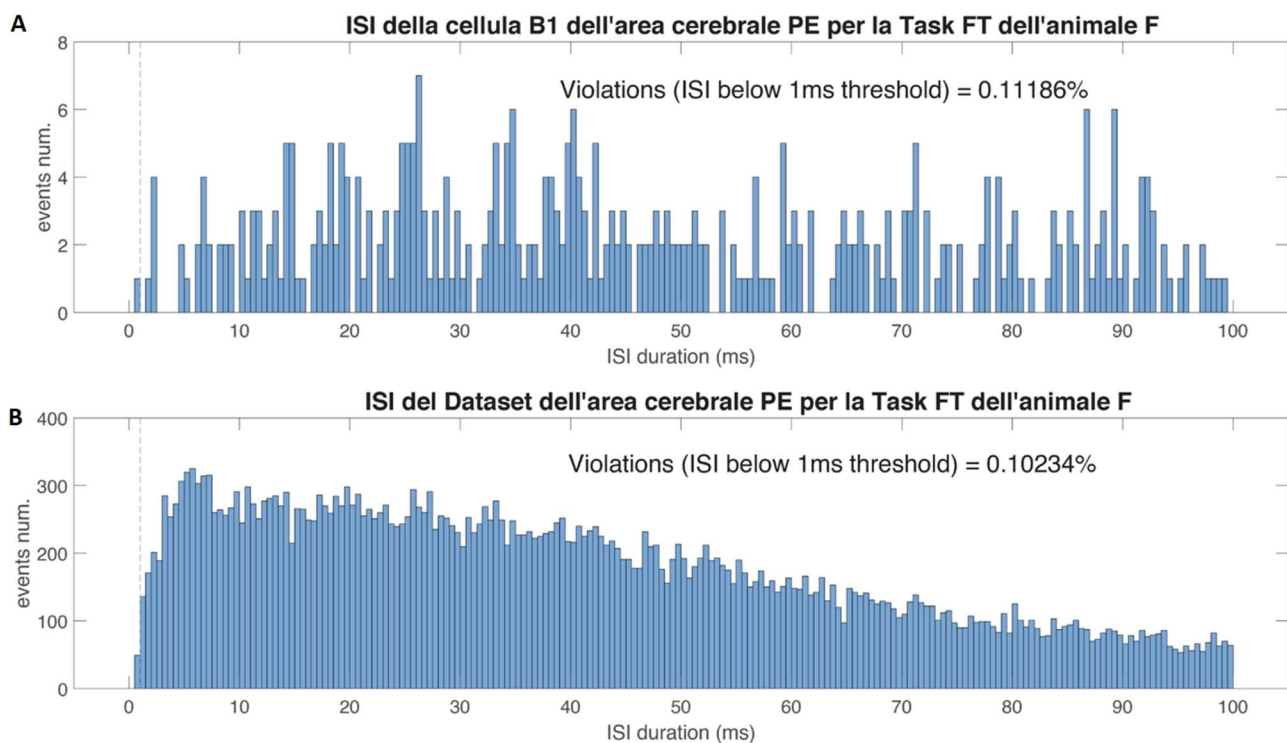


Figura 17 Sono rappresentati degli istogrammi che riportano le tempistiche ISI generati tramite lo script di MATLAB. Lungo l'asse delle ordinate si ha il numero di eventi registrati con un ISI di quella determinata durata, che invece è rappresentata lungo l'asse delle ascisse. Inoltre, per ciascun grafico generato, si ha una funzione che automaticamente calcola il numero di violazioni del periodo refrattario (1ms), dando una stima sulla bontà della registrazione. In A è rappresentato un ISI generato sulle informazioni della cellula specifica B1 dell'area PE appartenente al cervello dell'animale F per il compito FT, mentre in B si ha l'ISI generato con le informazioni di tutte le cellule relative a quella medesima area cerebrale per quello stesso compito.

Le percentuali di queste violazioni sono illustrate in *tabella 2* e sono state valutate inserendo nell'insieme delle violazioni quegli intervalli tra un potenziale d'azione e il successivo che fossero al di sotto di 1ms. Tali percentuali sono state calcolate valutando i dati di tutte le prove sperimentali appartenenti a quel determinato compito, per tutti i bersagli, di tutte le cellule relative a quell'area in modo da ottenere una visione globale della qualità delle registrazioni per ciascun compito di ciascuna area cerebrale.

	FT	F8Tall	FallT8
F. PE	0,1023%	0,0815%	0,1045%
F. PEc	0,9884%	1,1479%	1,2951%
F. V6A	0,1313%	0,1518%	1,3690%
S. PE	3,3501%	2,8449%	3,3724%
S. PEc	0,4805%	0,6003%	0,6313%
S. V6A	0,4991%	0,5205%	0,6086%

Tabella 2 La tabella riporta le percentuali di violazione dell'intervallo di periodo refrattario tra una scarica neurale e la successiva registrata. Quando l'intervallo è inferiore a 1ms, ciò indica una violazione del periodo refrattario del neurone, implicando che la scarica successiva registrata sia necessariamente attribuibile a un'interferenza.

4.3. Analisi del movimento oculare

Per quanto riguarda i movimenti oculari, risulta importante sottolineare che, se presenti nella fase di fissazione, potrebbero invalidare l'esperimento. Per effettuarne, dunque, la valutazione si è utilizzato lo script relativo (vedi paragrafo 3.5.3 "Raster Plot") all'analisi della posizione dell'occhio durante l'intera registrazione dei potenziali. L'algoritmo è stato eseguito selezionando randomicamente alcune registrazioni di cellule appartenenti alle tre aree analizzate, durante lo svolgimento dei tre compiti da parte dell'animale F (*Fig.18*) e dell'animale S (*Fig.19*). Questo ha permesso di effettuare una valutazione a campione della qualità delle registrazioni, permettendo di pescare i dati da tutti i file HDF5 generati, in modo da poter ottenere una valutazione complessiva della qualità delle registrazioni contenute in ciascuno di essi.

Come atteso, si nota la presenza di saccadi (bruschi cambi di posizione della pupilla) durante la fase di libertà di movimento dell'animale, durante la quale erano permessi i movimenti oculari (tra i marker Start e Fix on). Durante la fissazione, invece, si ha un appiattimento della linea rappresentante la posizione dell'occhio su asse X e Y, indice dell'assenza di saccadi, e quindi dell'immobilità dell'occhio dell'animale durante tale fase; questo accade fino al marker *Red off* che segnava lo spegnimento dell'ultima luce e il ritorno a una posizione di buio, in cui l'animale perdeva il punto di fissazione e tendeva a studiare nuovamente l'ambiente per elaborare il ritorno del braccio alla posizione di partenza. Le *figure 18 e 19*, inoltre, presentano un tracciato per la posizione dell'occhio sull'asse X e sull'asse Y. È interessante notare anche come il profilo di tali tracciati, differisca da una registrazione all'altra, in relazione alle coordinate del bersaglio soggetto della fissazione. Tale variazione della posizione di X e Y risulta in accordo con il design del pannello usato e con la posizione dei 9 bersagli in esso contenuti (*Fig.14*).

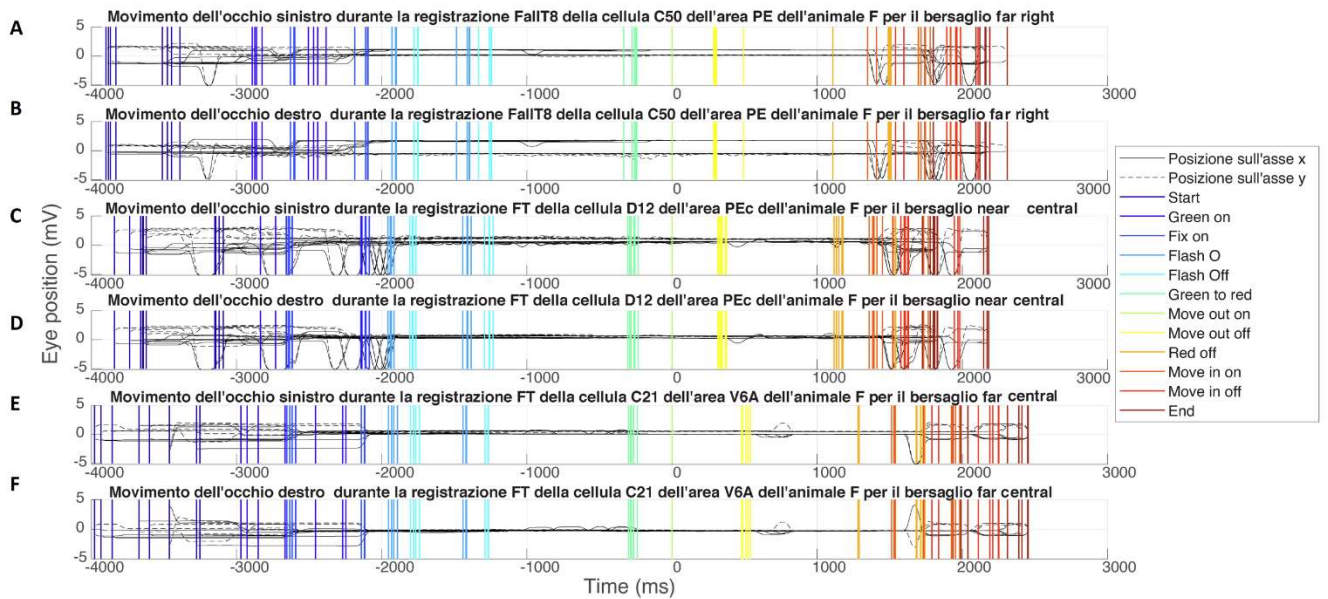


Figura 18 Le immagini riportano graficamente il movimento degli occhi dell'animale F durante i vari compiti. I pannelli A e B riportano le posizioni rispettivamente dell'occhio sinistro e destro durante alcuni trial eseguiti sull'area cerebrale PE; i pannelli C e D riportano il movimento dell'occhio sinistro e destro durante le prove sperimentali delle valutazioni effettuate sull'area cerebrale PEc; i pannelli E ed F, infine, riportano il movimento dell'occhio sinistro e destro durante le prove sperimentali delle valutazioni effettuate sull'area cerebrale V6A; sull'asse delle Y si ha il valore in mV della posizione dell'occhio dell'animale, registrata dall'oculometro (l'unità di misura del segnale è in mV perché si tratta di un'indicazione analogica che usciva dall'oculometro); sull'asse delle X si ha il valore temporale della registrazione (ms).

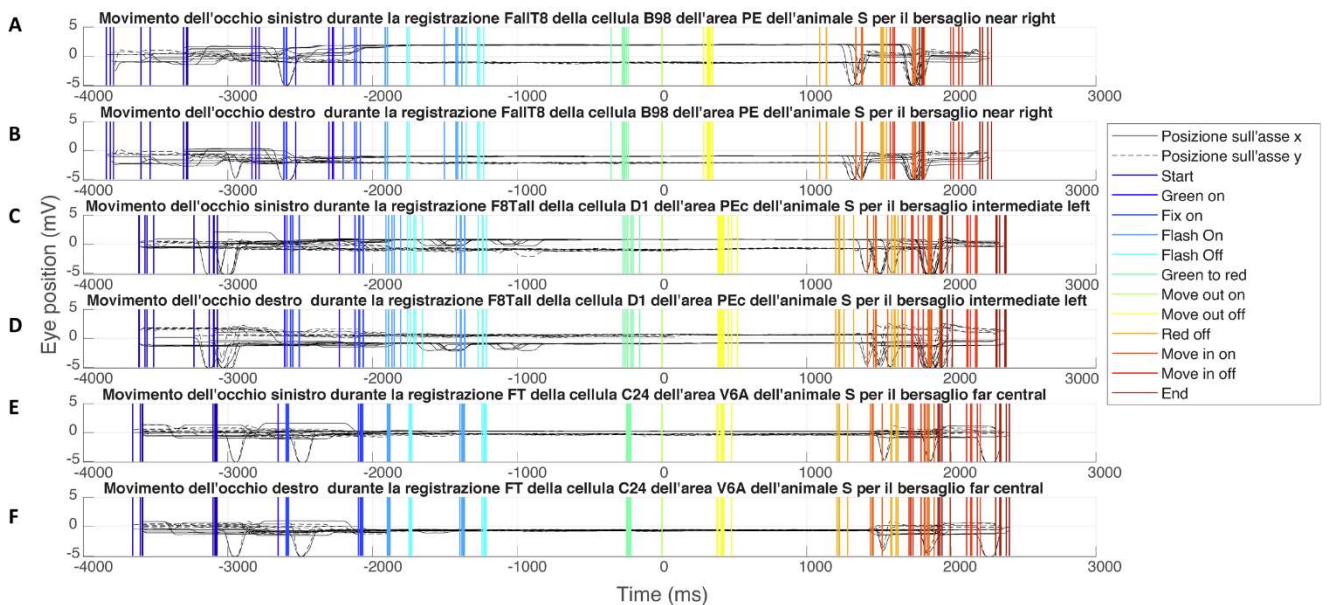


Figura 19 Le immagini riportano la posizione degli occhi dell'animale durante i vari compiti. I pannelli A e B riportano le posizioni rispettivamente dell'occhio sinistro e destro durante alcuni trial eseguiti sull'area cerebrale PE dall'animale S; i pannelli C e D riportano il movimento dell'occhio sinistro e destro durante le prove sperimentali delle valutazioni effettuate sull'area cerebrale PEc del medesimo animale; i pannelli E ed F, infine, riportano il movimento dell'occhio sinistro e destro durante le prove sperimentali delle valutazioni effettuate sull'area cerebrale V6A dello stesso animale; sull'asse delle Y si ha il valore in mV della posizione dell'occhio dell'animale, registrata dall'oculometro (l'unità di misura del segnale è in mV perché si tratta di un'indicazione analogica che usciva dall'oculometro); sull'asse delle X si ha il valore temporale della registrazione (ms).

5. DISCUSSIONE

Durante il lavoro di tesi, sono stati trattati dati elettrofisiologici registrati da tre aree cerebrali (V6A, PE e PEc) del lobulo parietale superiore della corteccia parietale posteriore di due esemplari di *Macaca fascicularis*. I dati sono stati estratti dal server dentro cui erano immagazzinati, e organizzati attraverso una struttura gerarchica all'interno di 6 file sfruttando il formato HDF5. Tali file sono stati, infine, analizzati tramite l'utilizzo di script MATLAB appositi per elaborare grafici Raster Plot, ISI, PSTH e del Movimento Oculare. L'analisi dei dati ha quindi rivelato risultati promettenti riguardo alla qualità e all'affidabilità delle registrazioni neurali disponibili.

Un primo controllo qualitativo è stato eseguito grazie alla visualizzazione dei dati attraverso Raster Plot che ha permesso di valutare la corretta registrazione degli eventi comportamentali del compito e il loro allineamento con i dati neurali.

Nel campo dell'elettrofisiologia, questo tipo di indagine preliminare, e in particolare il successivo studio dei PSTH, rappresentano la fase iniziale dell'analisi dei dati che permette di avere un'idea non solo dell'evento temporale in cui la rispettiva cellula risulta più attiva nella generazione dei potenziali d'azione, ma anche se essa è in qualche modo influenzata dalla posizione spaziale del bersaglio. A questo riguardo si faccia riferimento ai risultati precedentemente pubblicati da Bosco et al (2016) (*Fig.20*) e in cui si evince una chiara modulazione dell'attività di scarica del neurone per la diversa profondità (indicata in figura con 'near', 'intermediate', 'far').

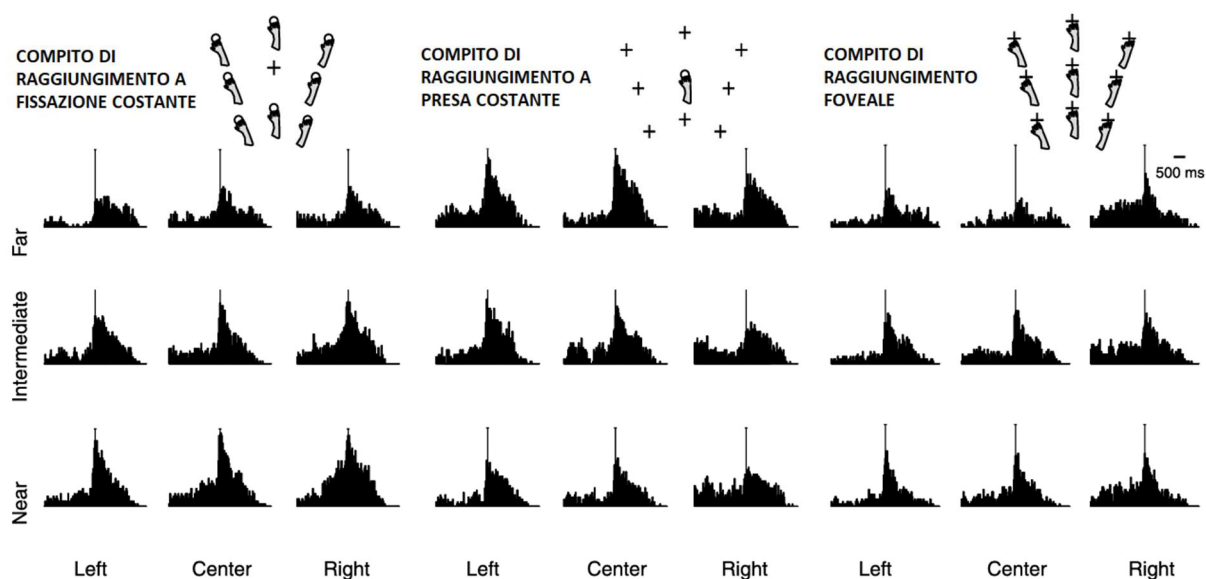


Figura 20 L'immagine riporta l'attività di una cellula appartenente all'area V6A analizzata tramite lo studio del PSTH. L'analisi è stata effettuata per le registrazioni dei potenziali avvenute durante lo svolgimento dei tre compiti di raggiungimento. Questo tipo di studio è stato importante perché ha rivelato come la cellula in questione mostri dei picchi più alti, e quindi una maggiore attività, in relazione alla profondità rispetto al bersaglio e alla posizione dell'occhio. Nel caso del compito di raggiungimento a fissazione costante si hanno dei picchi di attività maggiori per le posizioni vicine all'animale (near), rispetto a quelle lontane (far); invece, nel caso del compito di raggiungimento a presa costante si ha un'attività maggiore per i bersagli più lontani rispetto all'animale. La cellula, dunque, sembra attiva maggiormente nei casi in cui il bersaglio su cui effettuare la prensione sia più vicino al soggetto di quanto non lo sia il punto da fissare; dall'analisi del PSTH, è possibile dedurre quindi che la cellula sembri essere influenzata maggiormente dalla dimensione della profondità piuttosto che della direzione, e che codifichi il bersaglio di raggiungimento basandosi sulla posizione relativa dell'occhio e del bersaglio stesso nello spazio (adattata da Bosco et al., 2016).

La tabella delle percentuali degli Interspike Interval (*Tabella 2*), invece, ha fornito un'importante indicazione sull'integrità dei dati inseriti nei file HDF5. Le percentuali di violazione registrate per ciascun compito, nelle cellule delle 3 aree cerebrali esaminate (V6A, PE e PEc) nelle due scimmie coinvolte nello studio (F ed S), sono risultate essere molto basse. Questo risultato suggerisce che i dati siano generalmente privi delle probabili interferenze significative e che le cellule fossero state ben isolate.

Infine, l'analisi a campione del movimento oculare ha arricchito la valutazione qualitativa dei dati raccolti. I risultati hanno confermato la coerenza delle registrazioni neurali delle 3 aree per entrambi gli animali. In particolare, si osserva che nella maggior parte dei casi, la posizione dell'occhio è rimasta relativamente stabile durante la fase di fissazione (a partire da *Fix on*), mentre si sono verificati movimenti (saccadi) nei momenti che precedono questa fase. Questo è probabilmente dovuto al fatto che durante la prima parte di ogni ripetizione del compito, l'animale era libero di muovere gli occhi, e che prima dell'istruzione di fissazione vera e propria abbia studiato l'ambiente che lo circondava; i movimenti oculari possono costituire un confondente nell'analisi dei dati neurali dato che si è osservato che aree dell'SPL come V6A contengono neuroni che

rispondono in maniera significativa durante il periodo peri-saccadico (Kutz et al., 2003). Si sono osservati movimenti oculari piuttosto frequenti anche durante le fasi conclusive del compito, come durante l'evento di *move in on* e *move in off*. In queste fasi, il punto di fissazione scompariva ed era quindi normale che l'animale ricominciasse a esplorare lo spazio con movimenti oculari.

In sintesi, dunque, l'analisi dei dati relativi alle tre aree cerebrali esaminate - V6A, PE e PEc - ha confermato l'accuratezza nell'esecuzione dei compiti da parte dei due animali, grazie allo studio dei movimenti oculari, e l'integrità di tali dati grazie allo studio degli Interspike Interval; si sottolinea, anche il ruolo importante dello studio attraverso Raster Plots e PSTH, grazie ai quali, tali dati, potrebbero avere particolare rilevanza nel fornire indicazioni significative sul funzionamento delle tre aree cerebrali, oggetto dello studio, durante l'esecuzione dei compiti considerati.

I file ottenuti con il lavoro di tesi, quindi, potrebbero essere caricati su uno degli archivi attualmente esistenti per la condivisione di dati come DANDI o G-Node. Questi non sono altro che depositi pubblici online, nei quali i ricercatori nel campo delle neuroscienze possono condividere dati grezzi e metadati provenienti da studi scientifici in modo trasparente e accessibile alla comunità scientifica, per permettere poi ad altri colleghi di esaminarli, riutilizzarli o integrarli in nuovi studi promuovendo l'avanzamento della ricerca nelle neuroscienze così come una riduzione dell'impiego di animali evitando raccolte di dati ridondanti. Un dataset simile a quanto trattato nella tesi è già presente sulla piattaforma G-Node ed è liberamente scaricabile da chiunque (<https://doi.gin.g-node.org/10.12751/g-node.84zql6/>, Diomedi et al., 2024). Il dataset in questione contiene sei set di dati elettrofisiologici delle tre regioni (V6A, PEc, PE) all'interno del lobo parietale superiore (SPL) di due scimmie *Macaca fascicularis* durante un'attività che coinvolgeva il compito di raggiungimento foveale con ritardo istruito. Il repository ha un peso di 500MB e contiene dataset, metadati e alcuni script (per la generazione di grafici ISI e Raster Plot) in MATLAB e Python al fine di agevolare l'analisi da parte di eventuali utenti.

Un altro esempio è il dataset contenente dati elettrofisiologici e comportamentali registrati dalla corteccia motoria primaria (M1) e dalla corteccia premotoria dorsale (PMd) di quattro *Macaca rhesus*, ai fini di studiare come cambi la rappresentazione del movimento al livello cerebrale durante il processo di apprendimento (<https://dandiarchive.org/dandiset/000688/draft>, Perich & Miller, 2017).

6. CONCLUSIONI

I dati ottenuti dalle registrazioni condotte sui *Macaca fascicularis* si sono dunque rivelati di eccezionale qualità. Attraverso strumenti di analisi, dai più semplici come il Raster Plot, ai più complessi (come software e programmi che fanno uso di intelligenze artificiali), tali dati potrebbero agevolare la valutazione delle correlazioni tra le varie aree cerebrali e i movimenti corporei dell'animale, aprendo prospettive trasferibili successivamente all'ambito umano tramite approcci di medicina traslazionale.

In questo ambito, però, il lavoro da fare è ancora molto: i segnali cerebrali contengono informazioni preziose sullo stato mentale e sull'attività cerebrale del soggetto esaminato. Tuttavia, a causa della loro non stazionarietà e della suscettibilità a vari tipi di interferenze, il loro trattamento, analisi e interpretazione risultano ancora molto impegnativi (Barnova et al., 2023). Lo sviluppo repentino dell'intelligenza artificiale però, soprattutto nell'attuale decennio, ha aperto un nuovo spiraglio di speranza nel raggiungimento di tali ambiziosi risultati. L'idea della comunità scientifica è quella implementare un'intelligenza artificiale che possa utilizzare i dati registrati nelle sperimentazioni per apprendere e interpretare i potenziali neurali dei pazienti, per poi integrarli, ad esempio, in movimenti dell'arto artificiale.

Non si tratta di fantascienza: esistono infatti aziende già avviate in questo tipo di ricerca come la famosa *Neuralink* (Neuralink Corp, Fremont, California, USA) che si pone l'obiettivo di sviluppare interfacce cervello-macchina impiantabili, allo scopo di migliorare la vita delle persone con gravi lesioni cerebrali o al livello del midollo spinale (Fiani et al., 2021).

A tal proposito, l'attuale tesi si prefigge lo scopo di fornire dati utili al raggiungimento di tale fine e di sottolineare e incentivare l'impegno dei ricercatori, nel loro piccolo ma fondamentale contributo personale, di organizzare in modo coerente e rendere più efficiente l'accessibilità ai dati delle sperimentazioni cosicché si possa agevolare l'intera comunità scientifica e velocizzare il raggiungimento di questi ambiziosi obiettivi in grado di migliorare la vita di molte persone, come ad esempio l'implementazione di arti artificiali, già menzionata.

In conclusione, questa ricerca non solo ha arricchito la nostra comprensione del funzionamento del cervello e dei suoi legami con il movimento, ma ha anche gettato le basi per ulteriori studi e applicazioni che potrebbero rivoluzionare le tecnologie e migliorare il benessere umano; oltre che evidenziare l'importanza di una maggiore apertura della comunità scientifica riguardo alla condivisione dei dati e alla trasparenza, promuovendo così una ricerca più collaborativa e orientata allo sharing dei risultati che possa beneficiare tutti.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Bakola, S., Gamberini, M., Passarelli, L., Fattori, P., & Galletti, C. (2010). Cortical connections of parietal field PEc in the macaque: Linking vision and somatic sensation for the control of limb action. *Cerebral Cortex*, 20(11). <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq007>

Bakola, S., Passarelli, L., Gamberini, M., Fattori, P., & Galletti, C. (2013). Cortical connectivity suggests a role in limb coordination for macaque area PE of the superior parietal cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(15). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4685-12.2013>

Barnova, K., Mikolasova, M., Kahankova, R. V., Jaros, R., Kawala-Sterniuk, A., Snasel, V., Mirjalili, S., Pelc, M., & Martinek, R. (2023). Implementation of artificial intelligence and machine learning-based methods in brain-computer interaction. In *Computers in Biology and Medicine* (Vol. 163). <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2023.107135>

Borra, E., & Luppino, G. (2017). Functional anatomy of the macaque temporo-parieto-frontal connectivity. In *Cortex* (Vol. 97). <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2016.12.007>

Bosco, A., Breveglieri, R., Hadjidimitrakis, K., Galletti, C., & Fattori, P. (2016). Reference frames for reaching when decoupling eye and target position in depth and direction. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep21646>

Breviglieri, R., Bosco, A., Galletti, C., Passarelli, L., & Fattori, P. (2016). Neural activity in the medial parietal area V6A while grasping with or without visual feedback. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep28893>

Brodmann. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirn rinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*.

Carter, M., & Shieh, J. (2015). Chapter 4 – Electrophysiology. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*.

Chao, Z. C., Takaura, K., Wang, L., Fujii, N., & Dehaene, S. (2018). Large-Scale Cortical Networks for Hierarchical Prediction and Prediction Error in the Primate Brain. *Neuron*, 100(5). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.004>

De Vitis, M., Breviglieri, R., Hadjidimitrakis, K., Vanduffel, W., Galletti, C., & Fattori, P. (2019). The neglected medial part of macaque area PE: segregated processing of reach depth and direction. *Brain Structure and Function*, 224(7). <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01923-8>

- Diomedi S, Vaccari FE, Gamberini M, De Vitis M, Filippini M, & Fattori P. (2024) Neurophysiological recordings from parietal areas of macaque brain during an instructed-delay reaching task, DOI: 10.1038/s41597-024-03479-7, Scientific Data
- Diomedi S, Vaccari FE, Gamberini M, De Vitis M, Filippini M, & Fattori P. (2024). Single-cell recordings from three cortical parietal areas during an instructed-delay reaching task. G-Node. <https://doi.gin.g-node.org/10.12751/g-node.84zql6/>
- Fiani, B., Reardon, T., Ayres, B., Cline, D., & Sitto, S. R. (2021). An Examination of Prospective Uses and Future Directions of Neuralink: The Brain-Machine Interface. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.14192>
- Galletti, C., & Fattori, P. (2018). The dorsal visual stream revisited: Stable circuits or dynamic pathways? In *Cortex* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.01.009>
- Gamberini, M., Passarelli, L., Fattori, P., Zucchelli, M., Bakola, S., Luppino, G., & Galletti, C. (2009). Cortical connections of the visuomotor parietooccipital area V6Ad of the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 513(6). <https://doi.org/10.1002/cne.21980>
- Gamberini, M., Passarelli, L., Fattori, P., & Galletti, C. (2020). Structural connectivity and functional properties of the macaque superior parietal lobule. In *Brain Structure and Function* (Vol. 225, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01976-9>
- Hickok, G. (2009). The functional neuroanatomy of language. In *Physics of Life Reviews* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2009.06.001>
- Hubrecht, R. C., & Carter, E. (2019). The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. *Animals*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
- Impieri, D., Zilles, K., Niu, M., Rapan, L., Schubert, N., Galletti, C., & Palomero-Gallagher, N. (2019). Receptor density pattern confirms and enhances the anatomic-functional features of the macaque superior parietal lobule areas. *Brain Structure and Function*, 224(8). <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01930-9>
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., & Siegelbaum, S. A. (2012). *Principles of Neural Science, Fifth Edition (Principles of Neural Science (Kandel))*. In *Principles of Neural Science*.
- Kutz, D. F., Fattori, P., Gamberini, M., Breveglieri, R., Galletti, C. (2003) Early- and late-responding cells to saccadic eye movements in the cortical area V6A of macaque monkey. *Experimental Brain Research*.;149(1). doi:10.1007/s00221-002-1337-9

- Le, A., Vesia, M., Yan, X., Crawford, J. D., & Niemeier, M. (2017). Parietal area BA7 integrates motor programs for reaching, grasping, and bimanual coordination. *Journal of Neurophysiology*, 117(2). <https://doi.org/10.1152/jn.00299.2016>
- Luppino, G., & Rizzolatti, G. (2000). The organization of the frontal motor cortex. *News in Physiological Sciences*, 15(5). <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.5.219>
- Luppino, G., Ben Hamed, S., Gamberini, M., Matelli, M., & Galletti, C. (2005). Occipital (V6) and parietal (V6A) areas in the anterior wall of the parieto-occipital sulcus of the macaque: A cytoarchitectonic study. *European Journal of Neuroscience*, 21(11). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04149.x>
- Passarelli, L., Rosa, M. G. P., Gamberini, M., Bakola, S., Burman, K. J., Fattori, P., & Galletti, C. (2011). Cortical connections of area V6Av in the Macaque: A visual-input node to the eye/hand coordination system. *Journal of Neuroscience*, 31(5). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4784-10.2011>
- Perich, M. G., & Miller, L. E. (2017). Altered tuning in primary motor cortex does not account for behavioral adaptation during force field learning. *Experimental Brain Research*, 235(9). <https://doi.org/10.1007/s00221-017-4997-1>
- Premji, A., Rai, N., & Nelson, A. (2011). Area 5 influences excitability within the primary motor cortex in humans. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020023>
- Russel, W., & Burch, R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique* Russell WMS & Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. *Medical Journal of Australia*, 1(13).
- Seltzer, B., & Pandya, D. N. (1986). Posterior parietal projections to the intraparietal sulcus of the rhesus monkey. *Experimental Brain Research*, 62(3). <https://doi.org/10.1007/BF00236024>
- Vogt, C., & Vogt, O. (1919). *Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung*. *Journal of Psychology and Neurology*, 25.